

广东畜牧兽医科技

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

双月刊

1976年3月创刊

主管单位:广东省农业科学院

主办单位:广东省畜牧兽医学会

广东省农业科学院畜牧研究所

广东省农业科学院兽医研究所

主 编:蒋宗勇

副 主 编:孙彦伟

责任编辑:孙彦伟 岑俏梅

编委主任:蒋宗勇

编 委(排名不分先后):

蒋宗勇 余业东 王 浩 顾万军

曹俊明 辛朝安 廖 明 曾振灵

毕英佐 王贵平 舒鼎铭 孙彦伟

蔡建平 王政富 刘彩霞 岑俏梅

特邀编委:

陈 峰 余丽明 徐建浩 黄小建

陈小云 郑庆禄 贺湘仁 李 岩

林旭野

出版单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

地 址:广州市先烈东路135号(510500)

电 话:020-37245052 37288167

传 真:020-37245052

E-mail:gdmsyjkj@163.com

印刷单位:广州市人杰彩印厂

发行单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

出版日期:6月18日

发行范围:国内外公开发行

每期定价:5.50元

广告经营许可证号:440000100037



本刊声明:本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》、《中文科技期刊数据库》和“万方数据—数字化期刊群”。作者稿件一经本刊录用,将同时被上述三个数据库收录,进入因特网提供信息服务。作者如不同意,请在投稿时向本刊声明,否则本刊将视为同意收录。凡被本刊刊发的稿件,将一次性支付作者著作权使用报酬。

目 录

·专题综述·

- 量子点技术在生物医学中的应用概况.....何逸民,何兆祥(3)
- 奶牛子宫内膜炎病因的研究进展.....罗柏荣,高凤仙,等(6)
- 瘤胃调控剂在反刍动物上的应用.....李世霞,王梦芝(9)
- 金属硫蛋白在动物生殖系统中的定位与调控研究进展.....陈海燕,张 彬,等(11)
- 猪脑心肌炎.....严安毓,陈金闯,等(15)
- 乳酸杆菌的研究进展及其在畜牧业上的应用.....赵艳平,李建喜,等(18)

·畜牧技术·

- 宝饲迪对肉鸡生产性能的影响.....陈志虹,张 涛,等(20)
- 白文鸟的饲养与繁殖.....王 静,邓秋媚(22)
- 用外源生殖激素提高初产母猪产仔数的研究.....徐大光,吕建辉(25)

·兽医临床·

- 口蹄疫O型、Asia I型免疫抗体的检测.....王玉红,黄 炯,等(26)
- 芦荟干粉对鸭肝炎病毒人工感染雏鸭肝损伤的保护试验.....古飞霞,苏明辉,等(28)
- 使用畜禽疫苗应注意的问题.....陈华守,杨朝周,等(31)

·试验研究·

- 雷州黄牛促卵泡素受体基因(FSHR)的多态性分析.....魏伍川,黄 斌(33)
- 影响核移植后小鼠重构胚存活因素的研究.....彭礼繁,Tatiana Sviridova-Chailakhyan,等(35)
- 复方中药对热应激肉鸡血液自由基影响的研究.....邹洁建,王建荣,等(40)
- 氟苯尼考与多种抗菌药物联合应用对大肠杆菌的体外抑菌试验.....江 丽,雷淑珍(42)
- 猪链球菌病灭活疫苗(2型,HA9801株)的研制II...杨 球,游启有,等(45)

·宠物园地·

- 中国沙皮犬的起源、品种分化历程与保护.....刘清神(48)
- 一例猫慢性肾衰的诊治报告.....张盼锋,刘 宇(51)

·信息之窗·

- 热烈祝贺广东省动物育种与营养公共实验室顺利通过验收.....(14)
- 山东出台政策规定畜禽养殖禁止占用基本农田.....(24)
- 上海浦东生猪养殖场精细化管理初见成效.....(32)
- 春季全国重大动物疫病免疫情况大检查工作全面开展.....(47)
- 2008“永顺杯”优秀论文评选启事.....(52)

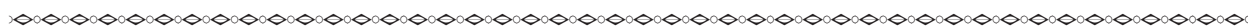
GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in march 1976(Bimonthly)

June.2008 Volume 33,Number 3 (Total No.139)

Main Content

- Applications of quantum dots technology on biomedicine*.....He Yimin, He Zhaoxiang(3)
- Research progress on the pathogeny of milch cow' s endometritis*.....Luo Bairong, Gao Fengxian, et al (6)
- Application of rumen regulators on ruminants*Li Shixia, Wang Mengzhi(9)
- Location and regulation of metallothionein in animal' s reproductive system*.....Chen Haiyan, Zhang Bin, et al(11)
- Swine Ecephalomyocarditis*Yan Anyu, Chen Jinshuan, et al(15)
- Lactobacillus and its application in husbandry*Zhao Yanping, Li Jianxi, et al(18)
- Influence of Baosidi probiotics on meat chicken' s reproductive performance*Chen Zhihong, Zhang Tao, et al(20)
- Breeding and reproduction of White Java sparrow*..... Wang Jing, Deng Qiumei(22)
- Exogenous reproductive hormone' s effect on increasing the born number of primiparous sows*•• Xu Daguang, Lv Jianhui (25)
- Detection of immune antibodies against type O and type Asia-1 FMD virus*Wang yuhong,Huang jiong(26)
- Protection of aloe addictive on the liver function of ducklings infected with duck hepatitis virus*Gu feixia,Su minghui(28)
- Polymorphism of follicle-stimulating hormone receptor gene of Leizhou scalper*.....Wei Wuchuan, Huang Bin (33)
- Factors affecting the survival of reconstructed mouse embryos after nuclear transfer*
.....Peng Lifan, Tatiana Sviridova-Chailakhyan, et al(35)
- Influence of Chinese herbal medicine compound preparation on free radicals in chicken blood during heat shock*
.....Zou Jiejian, Wang Jianrong, et al(40)
- Joint application of florfenicol and other antibiotics on Escherichia coli in vitro*..... Jiang Li, Lei Shuzhen(42)
- Manufacture of inactivated vaccine(strain HA9801) against Suis Streptococcus type 2 infection(II)*•• Yang Qiu, You Qiyu, et al(45)
- Origin, differentiation and protection of Chinese shar-pei dogs* Liu Qingshen(48)



Sponsored by:Guangdong Association of Animal Husbandry
and Veterinary Medicine,Institute of Animal
Science and Institute of Vererinary Medicine,
Guangdong Academy of Agricultural Sciences.

Published by: Editor Office Guangdong Journal of Animal
and Veterinary Science.

Chief Editor:JIANG Zong-yong

Vice Chief Editor ;SUN Yanwei

Editor Add:135 Xianlie Dong Lu, Guangzhou P.R. China

Post Code: 510500

Tel:(020)37245052 37288167

Fax:(020)37245052

E-mail:gdxmsy@163.com gdxmsy@163.com

量子点技术在生物医学中的应用概况

何逸民¹, 何兆祥², 冯春复³

(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642; 2. 湖南益阳市赫山区畜牧水产局, 湖南 益阳 413002;

3. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 黑龙江 哈尔滨 150001)

中图分类号: S852.6

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0003-03

量子点是一种特殊的纳米微粒,也称纳米量子点、半导体量子点(Quantum Dots, QDs)或半导体纳米微晶体(Semiconductor Nanocrystal),是由II~VI族元素(如CdS)或III~V族元素组成的小于100 nm的半导体纳米微晶体组成^[1,2]。这些纳米微晶体直径小于其玻尔直径(<10 nm),可以表现出独特的光学性质,从而对光电转换、传感、显示、生物成像等方面具有重要的影响。

从20世纪70年代末起,人们就开始对量子点进行的研究。量子点标记有许多优点^[3]:量子点被激发后可得到波长范围宽且光谱可调的荧光;量子点具有较大的斯托克位移和狭窄的荧光谱峰,使标记生物分子荧光谱的区分、识别变得更容易;量子点的荧光强度及稳定性是普通荧光染料的100倍左右^[4],同时,作为标记用的量子点荧光强度与持续时间和其所在的分散体系有关^[5];经各种化学修饰后的量子点生物相容性好,对生物危害较小。单独的量子点颗粒容易受杂质和晶格缺陷的影响,其荧光量子产率很低。量子点需要经过修饰后,才能更好地用于生物领域。通常标记生物分子的量子点(QDs)是一种核壳结构的物质,它是以一种量子点为核(CdSe等),在其外部使用另一种材料(ZnS等)形成表面的薄层。

虽然量子点的研究从20世纪70年代末就开始了,但是在生物学领域有突破性的进展较晚。1993年Murray等^[6]用一种高温的有机金属盐体系合成了高效发光的硒化镉(CdSe)量子点纳米晶体。1998年,Bruchez和Chan两个研究小组分别发表了将半导体量子点用作生物标记并适用于活体细胞体系研究成果^[3,7]。自此,半导体量子点用于生物医学标记受到广泛关注。此后经过科学家们的努力,量子点在生命科学、分析科学、材料

科学、检验检疫等传统及新兴领域逐渐发挥出越来越大的作用。

1 量子点在细胞及组织成像中的应用

细胞生物学中的一个重大突破就是活细胞成像,量子点可以在体内或体外标记活体细胞。杨蕊等在用量子点标记细胞时,直接用细胞电穿孔技术使量子点进入细胞,为量子点进入细胞提供了有效而简便的方法^[8]。钟丽云等^[9]用SNOM结合量子点标记进行T淋巴细胞体外刺激活化研究,杨蕊等^[10]对CdTe量子点在小鼠体内的生物学分布进行了研究,实验表明量子点在小鼠体内通过血液循环系统运输到肝脏和脾脏,24 h之内在这两种脏器中能够观察到量子点的存在,同时有红移现象发生。

同一波长的光可以激发不同的波长的量子点。根据量子点的这一优点,Tanke等^[11]用发橙黄色荧光的量子点标记高尔基体、发红色荧光的量子点标记细胞核、发绿色荧光的量子点标记微管,经单一波长光激发后,标记的3种物质显示不同的颜色。Wu等^[12]使用两种量子点对细胞核与细胞质内的微管同时进行标记,用于量子点与抗生物素蛋白链霉素耦合,该实验显示量子点作用的特异性。

2 量子点标记DNA分子的应用

经过恰当的修饰,量子点可以与DNA分子进行连接。目前已经有较多关于量子点标记DNA的报道。Mitchell等^[13]将以巯基丙酸修饰量子点表面,然后用末端带有巯基的DNA分子部分取代巯基丙酸,使DNA连接到量子点的表面,并作为寡核苷酸的荧光探针,使之能特异地与其互补配对的寡核苷酸进行杂交。Han等^[14]把可以发出不同光的量子点标记在一个微球上。这种QDs微球标记物的发射荧光能力和稳定性都很强,可以编成密码标记不同的

探针。根据微球上的量子点的种类和它们间的荧光强度的比例,确定特异的 DNA 序列,可以同时获得固定探针 DNA 和游离探针 DNA 的荧光信息。另外,由于量子点荧光探针 Stokes 位移大,激发峰宽,可以避免生物体的背景干扰。徐靖等^[15]用水溶性 CdTe/PCdS 量子点荧光探针同步荧光法测定 DNA,该方法简单快速、灵敏度较高。

3 量子点与蛋白质偶联的应用

随着人类基因组计划的顺利完成及后基因时代的到来,蛋白质组的研究已经成为生命科学的一个重要领域,人们迫切希望建立一些快速、高效、高通量的蛋白质分析方法。

Goldman等^[16]将 CdSe-ZnS 核壳层结构的量子点与抗体结合用于荧光免疫分析,认为免疫分析的荧光探针,是一种有效荧光示踪工具。李鸿梅等^[17]选择通过噬菌体表面展示肽库技术筛选得到的与胰岛素受体特异性结合的重组噬菌体克隆,将 QDs 标记到重组噬菌体上,研究其光谱学性质,检测了 QDs 标记后重组噬菌体对 K91 的浸染活性,通过 QDs 荧光标记 CHO2IR 细胞和小鼠肾组织切片直接观察到并证明噬菌体表面展示小肽与胰岛素受体的特异性相互作用。林章碧等^[18]利用水相合成量子点。他们通过改变体系的 pH 值,通过静电相互作用,可以使纳米粒子选择性地标记带正电荷的木瓜蛋白酶。

4 量子点在疾病诊断中的应用

肿瘤的诊断和治疗一直是人们研究的热点。由于量子点独特的优越性,故其用于肿瘤诊断的研究成为焦点之一。Wang 等用最大发射波长为 605 nm 的 QDs 来检测各类型样本卵巢中癌抗原 125 (CA125) 的表达。比较结果显示,量子点标记比传统的荧光染料更好,持续时间长,信号强。Hoshion 等^[4]通过内吞作用让量子点进入小鼠淋巴瘤细胞。在肿瘤转移的研究中,Voura 等通过量子点标记观察到了肿瘤细胞转移肺组织的 5 个入口。潘敏等制备出量子点-人表皮生长因子纳米荧光探针,这种荧光探针能识别卵巢癌细胞 SKOV-3^[19]。杨欢等分别利用量子点 QD605 或异硫氰酸荧光素 (FITC) 作为免疫荧光分析中的标记探针,通过激光扫描聚焦显微镜观察肾脏癌细胞中 HSP70 的表达。其在实验中发现,量子点 QD605 标记的图像信号都要比常用的荧光染料 FITC 标

记信号发光强度更高,更有特异性^[20]。

5 量子点的其他应用

由于量子点具有独特的性质,故量子点的应用较广。除上述应用外,量子点还用于高通量生物芯片、检测一些离子、一些亲和素等中。邵君等(2006)用水相合成的量子点标记链霉亲和素,然后用酶联免疫竞争抑制分析法检测链霉亲和素标记量子点后的生物活性,计算出 70.3%的链霉亲和素标记到量子点上,且具有生物活性^[21]。

量子点在生物芯片领域应用备受关注。芯片有高通量的基因或蛋白质,但是常规荧光探针一次只能进行有限的检测。量子点由于其独特的优点能用同一波长激发不同粒径的量子点,故可以同时检测所有标记的蛋白质或基因。

6 量子点存在的问题

量子点也有一些缺点和不足。由于制备量子点的某些材料通常有毒,所以量子点在生物环境中的安全性还有待进一步探讨。另外,修饰不恰当的量子点水溶性差、细胞毒性大、细胞膜穿透水平低等。量子点经过恰当的修饰可以弥补这些不足。

薛凤丽等用耦联剂 EDC 将具有跨膜转导功能的多肽 Tat 与水溶性 CdTe 量子点进行偶联,并用超滤膜反复超滤纯化,然后比较偶联产物与游离量子点进入 PLC 细胞的量。结果表明修饰后的量子点具有更高的细胞膜穿透性,更容易穿过细胞膜进入 PLC 细胞内部。

7 展望

量子点作为一种新技术,使生物荧光探针标记的技术产生了重大突破。量子点已成功地用于组织、细胞、蛋白质、核酸的标记。事实表明,量子点在生物领域将发挥越来越大的作用。目前,该技术应用于兽医学科研究还少见报道。随着量子点技术的发展,该技术将会在动物疾病诊断、核酸和蛋白质学的研究、生物素的检测或药物筛选等方面有较好的应用,展现出广阔的前景。

参考文献:

- [1] 谭翠燕,梁汝强,阮康成.量子点在生命科学中的应用[J].生物化学与生物物理学报,2002,34(1):15.
- [2] 林章碧,苏星光,张家骅,等.纳米粒子在生物分析中的应用[J].分析化学,2002,30(2):237-241.
- [3] Brucher M J, Moronne M, Gin P, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels[J]. Science,

- 1998, 281(25):2013-2016.
- [4] Hoshino A, Hanakik, Suzuki K, et al. Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, (314):46-53.
- [5] Hanaki K, Momo A, Oku T, et al. Semiconductor quantum dot albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 302(3):496-501.
- [6] Murray C B, Norrid D J, Bawendi M G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E=sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites[J]. *J Am Chem Soc*, 1993, 115(19):8706-8715.
- [7] Chan W C W, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection[J]. *Science*, 1998, 281(5385):2016-2018.
- [8] 杨蕊, 冀伟, 闫玉禧, 等. 电穿孔法在量子点标记细胞中的应用[J]. *高等学校化学学报*, 2005, 26(6):1043-1045.
- [9] 钟丽云, 廖陶陶, 王小平, 等. SNOM 结合量子点标记进行 T 淋巴细胞体外刺激活化的研究[J]. *电子显微学报*, 2006, 25(5):401-404.
- [10] 杨蕊, 冀伟, 闫玉禧, 等. 量子点在小鼠体内的生物学分布[J]. *吉林大学学报*, 2005, 43(6):863-866.
- [11] Tanke H J, Dirks R W, Raap T. FISH and immunocytochemistry: Towards visualising single target molecules in living cells[J]. *Current Opinion Biotechnology*, 2005, 16(1):49-54.
- [12] Wu X Y, Liu H J, Liu J Q, et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(1):41-46.
- [13] Mitchell G P, Mirkin C A, Letsinger R L. Programmed assembly of DNA functionalized quantum dots[J]. *J Am Chem Soc*, 1999, 121(35):8122-8123.
- [14] Han M Y, Gao X H, Su J Z, et al. Quantum dot tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules[J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(7):631-635.
- [15] 徐靖, 赵应声, 吴新国, 等. 水溶性 CdTe/PCdS 量子点荧光探针同步荧光法测定 DNA[J]. *武汉大学学报*, 2006, 52(2):129-132.
- [16] Goldman E R, Clapp A R, Anderson G P, et al. Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents[J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(3):684-688.
- [17] 李鸿梅, 刘含智, 张皓, 等. 量子点荧光标记在重组噬菌体表明展示肽与胰岛素受体相互作用的应用[J]. *高等学校化学学报*, 2004, 25(5):982-984.
- [18] 林章碧, 张皓, 陈奇丹, 等. 利用水相合成的量子点标记木瓜蛋白酶的研究[J]. *高等学校化学学报*, 2003, 24(4):609-611.
- [19] 潘敏, 储茂泉, 孙焯, 等. 量子点与多肽 LyP-1 的连接、表征及对肿瘤细胞的识别[J]. *生物医学工程学杂志*, 2007, 24(3):577-581.
- [20] 杨欢, 张杰, 吕蔡, 等. 在量子点探针引导下共聚焦显微镜检测肾癌组织 HSP70 的表达意义[J]. *中国体视学与图像分析*, 2006, 11(1):1-4.
- [21] 邵君, 尤晓刚, 高峰, 等. 量子点标记链霉亲和素及其生物活性检测[J]. *分析化学研究简报*, 2006, 11(34):1625-1628.

· 书讯 ·

《兽医临床难病新解》简介

兽医临床工作者廖斌发、廖启武编著的《兽医临床难病新解》一书已于近期由湖北科学技术出版社出版, 面向全国公开发行。

书中就当前流行或散发的猪瘟、疑似猪瘟、圆环病毒病、蓝耳病、伪狂犬病、链球菌病、水肿病、附红细胞体病、无名高热等病毒、细菌、原虫病以及其混合感染的温热病等一百多个热门话题, 运用中兽医模糊黑箱理论, 通过病例, 新解难病, 治法独特, 疗效灵验, 且具有现代科学性、时髦实用性、简单操作性。可谓是一书在手, 解难不愁。可供养猪场、养殖专业户及广大农村基层畜牧兽医技术人员在兽医临床实践中参考, 也可作为农业大专院校师生和科技人员启迪资料。

附言: 该书售价 35 元 / 本 (含包装邮费)。需要者从邮局汇款到湖北省天门市根瘟灵研究所 (马湾) 廖斌发收, 邮编: 431715, 汇单附言栏内注明“难病新解”。

联系电话: 0728-4561354 (兼传真)

手 机: 13872992321 13707222763

奶牛子宫内膜炎病因的研究进展

罗柏荣¹, 高凤仙¹, 肖兵南²

(1. 湖南农业大学动物科技学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南省畜牧兽医研究所, 湖南 长沙 410131)

摘要: 奶牛子宫内膜炎是奶牛养殖业中的常发病, 其致病因素呈现复杂性和多样性。本文通过对饲养管理、病原微生物感染、营养、机体特定生理期血液和激素水平等因素的综述, 以期整体阐述该类疾病的病因, 更好的制定出治疗方案。

关键词: 奶牛; 子宫内膜炎; 病因; 进展

中图分类号: S858.23

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0006-03

子宫内膜炎是奶牛养殖业中的常见疾病, 是导致奶牛不孕的主要原因, 使奶牛生产性能大幅度降低, 造成巨大的经济损失。国内外一直致力于子宫内膜炎药物的开发, 但由于引起该病的病因复杂多样, 临床疗效不尽相同。为更好地预防和治疗子宫内膜炎, 特将该病的病因综述如下。

1 病因

1.1 奶牛自体因素 奶牛在间情期、围产期等特定生理阶段, 体内的某些激素增加或减少, 导致免疫功能低下, 继而对病原微生物易感, 易患子宫内膜炎。随着病情的发展, 细胞外液(如血液等)的成份和数量均发生改变(如黏度增高, 纤维蛋白原含量快速增加等), 造成微循环障碍, 发生“血瘀”, 使病情更加严重。奶牛患病、遗传效应等因素亦在一定程度上诱发子宫内膜炎。

1.1.1 体液水平、性质的改变 国内外研究表明, 奶牛子宫内感染微生物以及感染的轻重, 与机体的体液水平有着直接或间接的关系。奶牛在发情期(雌激素优势期)免疫功能增强, 而在间情期(孕酮优势期)免疫功能下降, 子宫对疾病易感性增强^[1]。雌激素主要是促进子宫颈口开放, 子宫肌肉收缩, 使胎衣、子宫炎性分泌物排出体外, 使子宫内膜增生, 增强生殖道防御微生物的能力^[2,3]。叶选怡等^[4]发现患牛血液中雌二醇含量比正常奶牛低, 在分娩当天约低 1/3。葛利江等^[5]对产后早期奶牛注射外源性雌激素, 结果可提高机体特异性和非特异性免疫力, 保护子宫免受感染。Ahmed 等^[6]研究水牛发情期和黄体期的子宫分泌物时发现, 发情期分泌

的白细胞数量及吞噬活性和总 Ig 量均显著高于黄体期。以上试验表明, E2 (Estrogen, 雌二醇) 等雌激素对母牛免疫功能有增强作用。对于 E2 促进免疫的机理, 有学者认为可能是在母牛发情时, E2 增强了吞噬细胞表面 MHC II (Major Histocompatibility Complex II, 主要组织相容复合体 II) 分子的表达。MHC II 分子促进了抗原递呈, 供更多淋巴细胞识别, 从而促进细胞和体液免疫反应^[7]。

母牛子宫局部的免疫功能除与 E2 和 P4 (Progesterone, 孕酮) 有关外, 还受前列腺素 (PG)、促肾上腺皮质激素 (ACTH)、皮质醇、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 及生长激素 (GH) 变化的影响。

血液作为机体的细胞外液, 当子宫受到感染时, 其组份均会发生数量或性质上的改变, 不利于疾病的痊愈。何永明等^[8]报道, 产后患气虚血瘀症的奶牛, 血浆 SOD 活性显著低于产后同时间健康牛, 而 MDA (Malondialdehyde, 丙二醛) 水平显著高于同期健康牛。这两项指标表明患牛体内清除自由基的反应失衡。机体清除自由基的能力下降, 积累过剩的自由基首先与线粒体内外膜脂肪酸发生脂质过氧化, 破坏膜脂层结构, 导致膜脂层排列松散, 内膜嵴减少, 合成 ATP 的效率降低, 形成自由基失衡反应诱发的细胞结构与功能交替损伤的恶性循环, 以致维持正常生命活动的能源(气力)不足, 产生各种气虚证候。另外, 体内脂质过氧化反应增强, 清除氧自由基能力减弱, 造成体内自由基反应紊乱、微循环障碍与血瘀证, 极易感染病原菌。产后 3~10 天患子宫内膜炎奶牛的全血粘度、

全血还原粘度、血浆粘度、红细胞聚集指数、红细胞刚性系数和纤维蛋白原含量均极显著高于临床健康牛^[9,10]。王清兰等^[11]报道,正常奶牛在产后1~3天内,全血粘度、全血还原粘度、红细胞聚集指数、血浆粘度和血浆纤维蛋白原等迅速升高,达产后最高值,在临床上具有重要的生理意义。它们可以加速血凝过程和防止产后大出血,增加血液循环的外周阻力,保障机体有效血容量的供给,以促进产后整体机能的恢复。而患病奶牛该类指标的升高,则血液粘度明显升高,红细胞的变形能力下降,导致微循环障碍,使机体尤其是子宫的血流阻力增大,血流灌注量减少,而发生“血瘀”,使子宫易受病原微生物感染;奶牛患子宫内膜炎后,由于球蛋白、纤维蛋白原等血液中急性期反应物质迅速增多,使血液粘度进一步升高,反过来又加速病情的发展,形成恶性循环。

1.1.2 继发性因素 子宫内膜感染可继发于其他疾病,特别是围产期产科疾病治疗不当、不彻底。阴道炎、子宫颈炎、子宫弛缓、子宫脱出、阴道脱出、胎衣不下等治疗不彻底,或发生结核病、布氏杆菌病、黏膜病、传染性鼻气管炎、创伤性网胃-心包炎等疾病时,常常使子宫复旧延迟、恢复缓慢而继发子宫内膜炎。清宫时子宫内灌注高浓度的Lugo1'S液或某些抗生素,可引起子宫内膜的炎症和细胞坏死。产后护理不当易造成子宫弛缓、恶露蓄积而继发子宫内膜炎。奶牛患酮病时子宫内膜炎发生率增加。

1.1.3 遗传效应 一些品种奶牛因自然抵抗力低而易发病。如黑色杂种母牛是在另一种生态条件下形成的,因而机体抵抗力较低,易发生疾病。据报道^[12],黑色杂种母牛的发病率比红色草原种母牛约高2倍。有资料显示,奶牛子宫炎症与产犊胎次存在一定的联系。产犊胎次在2~4胎之间的母牛发病率明显增高。

1.2 传染性因素 子宫内膜炎的直接病因是病原微生物的感染。据报道,能引起子宫感染的病原微生物有细菌、病毒、真菌、支原体、毛滴虫及钩端螺旋体等^[12]。细菌是引起子宫内膜炎的最重要病原微生物,且种类很多,单一感染和混合感染同时存在。从子宫内膜炎患牛子宫内分离的细菌主要有链球菌、葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、芽孢杆

菌、棒状杆菌、变形杆菌、布氏杆菌等。不同地区的奶牛所分离到的细菌也不完全相同。曹伯宏等^[13]调查表明,葡萄球菌、链球菌及大肠杆菌、化脓性棒状杆菌等是引起子宫炎的主要病原菌。赵红琼等^[14]对新疆地区的患牛子宫分泌物进行分离鉴定,蜡样芽孢杆菌所占比例最高,为24.5%,其余依次为非溶血性链球菌、大肠杆菌、溶血性链球菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、胎儿弯曲杆菌等。另据报道,子宫内膜炎也可由大量非致病性细菌侵入子宫内过度增殖而引起^[15]。

酵母菌和病原性真菌如念珠菌、毛霉菌等都可引起奶牛子宫内膜炎。杨克礼等^[16]在对30份子宫内膜炎病料进行病原菌分离试验时,分离到2株酵母菌,阳性率为6.67%,是否具有致病性有待进一步研究。吴明楼等也分离到酵母菌和霉菌,且两者检出率分别为6.5%和8.7%。据初步分析,致病性真菌检出率的升高可能与长期使用抗菌药物有关。

有些病毒也可直接引起奶牛子宫内膜炎。Frazier等^[17]指出,牛4型疱疹病毒可引起奶牛子宫内膜炎和其他繁殖性疾病。可以引起子宫炎症的病毒还有牛传染性鼻气管炎病毒、牛病毒性腹泻病毒等。

国外从奶牛生殖道中分离出T支原体和生殖道支原体。据报道,毒力最强的是生殖道支原体-B2。毛滴虫、钩端螺旋体常是寄生于阴道而后入侵子宫造成炎症,衣原体也可引起子宫炎症。

1.3 人为因素 在奶牛养殖业中,奶牛运动不足,营养不全面等,将使奶牛体质变弱,免疫机能下降。若畜舍卫生条件差,外界环境病原微生物污染严重,则子宫感染率明显上升。

1.3.1 营养因素 日粮配置不合理或营养素不全,维生素及矿物质缺乏,或者矿物质比例失调时,母牛的抗病力降低,容易发生子宫内膜炎。围产期奶牛能量代谢的特点是能量负平衡,此时奶牛糖代谢紊乱,血糖降低。杜万欣等^[18]报道,干乳期奶牛的营养需求远远低于泌乳牛。如营养过于丰富,将造成母牛过肥,导致难产,同时也易引发胎衣不下、子宫内膜炎以致不孕症。微量元素中Zn、Se、Co、Mn、I、Cu、Fe和维生素A、B₁、D、E的缺乏,或钙、磷比例失调,长期饲喂大量的蛋白质、脂肪、碳水化合物饲料,容易引起奶牛繁殖障碍疾

病。最常见的有胎衣不下、子宫轻度感染和子宫内膜炎^[19~21]。土壤中 Co、Mg、Mn 和其他微量元素缺乏的地区,即使在夏季放牧期获得其他营养价值较全的情况下,大多数牛也易发生胎衣不下和子宫内膜炎。麻延峰等^[22]对 30 头奶牛血液样本进行检测发现,血液血红蛋白低于正常生理水平的奶牛易发子宫内膜炎,其可能原因是奶牛营养不良,继而免疫力下降,导致奶牛多发子宫炎且难于治愈。

1.3.2 操作管理不当 人工授精时消毒不严,输精操作鲁莽,产后子宫及产道粘膜充分扩张,胎儿产出及助产等机械作用造成粘膜浅表严重损伤,均会给病原菌入侵创造条件。产后饲喂过量的多汁块根和糟类副料,盲目催奶致泌乳过多,引起代谢性酸中毒和乳房炎等疾病也可引发子宫内膜炎的发生。

饲养管理不科学,如光照不足、缺乏运动、畜舍夏季气温过高、环境潮湿等,均会导致病原菌侵入子宫造成感染。如夏季的热应激常引起母牛激素分泌失调,代谢紊乱,造成通向胎盘的血管扩张,血液供应增多,绒毛膜绒毛在腺窝内膨胀,使分离困难,从而导致胎衣不下增多^[23]。黄群山等^[24]指出热应激是奶牛胎衣不下的一种诱发因素。在炎热夏季,奶牛胎衣不下病例呈现上升的趋势。国外报道,奶牛在分娩过程中都表现出程度不同的应激,由此而产生的肾上腺素可以通过子宫肌上的特异性受体,影响分娩过程和胎衣的排出,即抑制子宫的收缩。由于应激造成子宫收缩无力,以致胎衣不能排出,而胎衣不下的牛往往继发子宫内膜炎。

2 结语

综上所述,导致奶牛子宫内膜炎的病因是复杂和多方面的。在生产中,除加强饲养管理、改善环境卫生、严格无菌操作、积极治疗原发病外,还应注意奶牛分娩前后这一特定时期的血液状况和生理激素水平,综合分析,辩证论治,制定合理的治疗方案,才能够获得理想的治疗效果。

参考文献:

- [1] Gregory S L. Uterine health and disorders[J]. J. Dairy Science, 1997, 80(5): 984-994.
- [2] 王廷斌,戴志江,张桂英,等. 雌激素在奶牛生产中的应用[J]. 黑龙江动物繁殖, 2001, 9(4): 27-28.
- [3] 薛志成. 雌激素在奶牛生产中的应用[J]. 中国奶牛, 2004, (5): 38-39.
- [4] 叶选怡,陈海燕,傅衍. 奶牛胎衣不下与乳中孕酮、雌二醇含量的关系[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(1): 119-121.
- [5] 葛利江,李克祥,苏道斌,等. 雌激素对产后奶牛免疫功能、子宫感染的影响研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1999, (10): 25-26.
- [6] Ahmed W M, Nada A R, Shalaby S I A, et al. Uterine humoral and cellular immune response in some case of genital disorders in buffaloes[J]. Reproduction in Domestic Anim, 1993, (28): 298-301.
- [7] Cobb S P, Wasten E D. Immunohistochemical study of immune cell in the bovine endometrium at different stages of the oestrous cycle[J]. Res Vet Sci, 1995, (59): 238-241.
- [8] 何永明,王清兰,焦淑贤. 奶牛产后气虚血瘀证与血浆 SOD、MDA 变化的关系[J]. 中国兽医学报, 2001, 21(4): 392-394.
- [9] 刘翠艳,李呈敏. 孕宝对子宫内膜炎奶牛血液流变学变化的影响[J]. 中国兽医杂志, 1999, 25(3): 29-30.
- [10] 吴金节,章孝荣,刘亚,等. 奶牛子宫内膜炎防治前后血液流变学参数的变化[J]. 南京农业大学学报, 2000, 23(2): 65-68.
- [11] 王清兰,焦淑贤,陈德民,等. 奶牛围产期血液流变学主要指标的变化规律[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(6): 574-576.
- [12] 李世宏,杨国林,杨锐乐,等. 奶牛子宫内膜炎研究进展[J]. 中国奶牛, 2007, (1): 34-38.
- [13] 曹伯宏,吴雅玲. 奶牛子宫炎的诊断及预防[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2004, 34(1): 34-36.
- [14] 赵红琼,黄燕,陈杖榴,等. 新疆地区奶牛子宫内膜炎病原菌的分离鉴定及其地抗菌药的敏感性试验[J]. 中兽医医药杂志, 2005, (2): 16-19.
- [15] 葛利江,田文儒,宣长和. 母牛子宫内膜免疫的调控[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2001, (9): 31-32.
- [16] 杨克礼,潘玲,章孝荣. 奶牛子宫内膜炎病原菌分离试验[J]. 中国奶牛, 2006, (8): 39-40.
- [17] Frazier K, Pence M, Mauer M J, et al. Endometritis in postparturient cattle associated with bovine herpesvirus-4 infection: 15 cases[J]. J Vet Diagn Invest, 2001, 13(6): 502-508.
- [18] 杜万欣,陈奎. 奶牛干乳前期的饲养管理[J]. 河南畜牧兽医, 2007, 28(6): 38-39.
- [19] 岳春旺,孙茂红,段刚,等. 奶牛子宫内膜炎综述[J]. 中国草食动物, 2004, 24(2): 44-46.
- [20] 刘翠艳,李呈敏,李雨来. 微量元素缺乏与母畜不孕症[J]. 畜牧与兽医, 2000, 32(1): 39-40.
- [21] 佟承刚. 母兔不孕症发生因素及防治[J]. 中国养兔杂志, 2000, (5): 21-23.
- [22] 麻延峰,傅春泉,王宏艳,等. 金华地区奶牛子宫内膜炎的血常规变化研究[J]. 中国奶牛, 2007, (4): 29-32.
- [23] 吴结革,茆达干. 热应激对动物生殖机能的影响及其作用机理[J]. 家畜生态学报, 2006, 27(6): 169-172.
- [24] 黄群山,劳锦华,梁龙. 奶牛分娩卫生与胎衣不下关系初探[J]. 广东畜牧兽医科技, 2001, 26(2): 28-29.

瘤胃调控剂在反刍动物上的应用

李世霞, 王梦芝

(扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 瘤胃发酵在整个消化过程中起着重要的作用, 因此添加适宜的瘤胃发酵调控剂可以调节瘤胃内环境, 利用其在瘤胃中的作用机理来改变瘤胃微生物等的生物活性, 提高饲料利用率, 增加产奶量, 提高乳汁率等。本文综述了几种瘤胃发酵调控剂在反刍动物中的应用, 如半胱胺、植物提取物、离子载体、酵母培养物及脲酶抑制剂。

关键词: 瘤胃; 调控剂; 反刍动物; 应用

中图分类号: S853.733

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0009-02

反刍动物的瘤胃就像一个复杂的发酵罐, 在整个消化过程中起着重要的作用。瘤胃发酵有助于反刍动物将其它动物难以利用的粗纤维分解成可利用的挥发性脂肪酸(Volatile Fatty Acid, VFA), 并可利用非蛋白氮(Nonprotein Nitrogen, NPN)或发酵产物来合成含各种必需氨基酸的微生物蛋白质, 利用发酵产物合成各种B族维生素, 从而将低品质的饲料改造成富含微生物蛋白质的高品质饲料^[1]。瘤胃调控剂对反刍动物的发酵起着重要作用, 在日粮中添加有益的调控剂, 可改善瘤胃内环境, 增强瘤胃微生物活性, 促进菌体蛋白的合成, 提高粗纤维消化率, 从而增强生产性能^[2]。近几年报道的瘤胃调控剂主要有以下几种。

1 半胱胺

半胱胺(cysteamine), 又名 β -巯基乙胺, 为乙酰辅酶A的组成部分, 因含有性质活泼的巯基和氨基而具多种生物功能, 是动物体内的生物活性物质, 具有重要的生理作用。众多的研究表明, 半胱胺可改善瘤胃内的消化代谢, 能通过耗竭体内生长抑制素, 提高神经和外周内源性生长激素水平和IGF-1的浓度, 起到促进动物生长的作用。王全军等^[3]研究了半胱胺对山羊瘤胃微生物体外发酵的影响, 结果表明, 半胱胺浓度为50 mg/L时, 对瘤胃微生物发酵影响最为显著, 培养液中氨氮浓度比对照组降低5.7%, 微生物蛋白浓度、总挥发性脂肪酸浓度、丙酸比例和体外发酵总产气量分别比对照组提高66%、56%、6%和11.4%。刘宗柱等^[4]发现, 人工瘤胃中添加半胱胺可降低发酵液中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度, 提高微生物蛋白的浓度。

2 植物提取物

2.1 丝兰提取物 丝兰提取物的主要成分为甾类皂苷(萨洒皂苷配基 Sarsapogein)、菝葜配基(Smilagenin、龙舌蓝皂苷配基 Hecogenin)、自由皂苷(Saponin-free)和糖类复合物(Gly-Components)。丝兰皂苷(Sarsa-saponine), 是从丝兰属植物中提取出的一种具有生物活性的物质, 也是最早应用于饲料生产的皂苷类之一。Ryan等^[5]和Hussain等分别在绵羊和肉牛日粮中添加丝兰提取物, 结果使绵羊和肉牛瘤胃中 NH_3 显著降低($P < 0.01$), 尿素浓度明显下降($P < 0.05$)。在奶牛体外瘤胃液试验中, 添加丝兰属提取物, 能显著降低甲烷的产生, 减少能量损失, 降低环境污染。Harind等通过对瘤胃气体生成量、菌体转化率、氨水平、原虫的评定, 确认丝兰皂苷可增加菌体生成量, 减少气体(CO_2 、 CH_4)产生, 提高饲料转化率。Girard^[6]指出, 添加丝兰提取物可使瘤胃乙酸浓度下降($P < 0.05$), 丙酸浓度上升($P < 0.05$)。丝兰提取物具有强烈的抗原虫类微生物活力的能力, 降低原虫类微生物数量, 有利于瘤胃氮的利用, 增加微生物蛋白流向小肠的数量。

2.2 茶皂素 又称茶皂苷, 是存在于茶种子和茶叶中的皂素成分, 是由配基、糖体和有机酸三部分组成的一类五环三萜类化合物, 是一类齐墩果烷型三萜类皂苷的混合物。其苷系是 β -香树素衍生物, 糖部分主要有阿戊糖、木糖、半乳糖及葡萄糖醛酸等, 有机酸包括当归酸、惕各酸、醋酸和肉桂酸等。苑文珠^[7]经过研究证明, 添加茶皂素不影响瘤胃的正常发酵。茶皂素提高了瘤胃发酵产气

量,增加了培养液发酵 TVFA (挥发性脂肪酸总量)及乙酸、丙酸、丁酸的浓度,改变了瘤胃微生物状况,抑制了瘤胃原虫的生长,降低了原虫数量,并且增加了瘤胃微生物蛋白的产量,为动物的生长提供了更多的可利用蛋白。

2.3 毛茛科植物提取物 毛茛科植物提取物是一种含生物碱类物质的植物粗提物。张元庆等^[8]证实添加毛茛科植物提取物能明显改变体外动态发酵模式,并能有效改变发酵液的 pH 值、NH₃-N 浓度、TVFA 和乙酸、丙酸、丁酸的摩尔比例。添加 200~300 mg/L 毛茛科植物提取物时,能明显提高小麦粉体外发酵液的 pH 值以及改变 VFA 比例。

3 酵母培养物

酵母培养物 (Yeast Culture, YC) 是指活体酵母细胞及其生产基质,是一种直接饲用微生物。酵母属于一种微生态制剂,它营养丰富,富含多糖、维生素、矿物质、消化酶、促生长因子和较齐全的氨基酸,具有良好的适口性,能增强免疫力,促进生长,是集营养、保健为一体的饲料添加剂。近年来 YC 在反刍动物上应用较多,大量的试验结果表明,日粮中添加 YC 对反刍家畜瘤胃微生物的浓度产生显著影响, YC 能提高厌氧菌尤其是纤维分解菌的数量。日粮中添加 YC 能有效地提高瘤胃液 pH 值^[9],促进反刍兽新月型单胞菌对乳酸的利用,从而稳定瘤胃液 pH 值,降低瘤胃液氨氮浓度,增加 TVFA 产量,降低乙酸、丙酸比例^[10]。但 Williams 等^[11]发现,添加 YC 不改变瘤胃液 TVFA 浓度,仅使乙酸、丙酸比例降低。苑文珠等^[7]报道,反刍动物饲喂高精料日粮容易引起瘤胃 pH 值降低,造成瘤胃机能障碍。通过添加酵母菌制剂可提高乳酸的利用,使瘤胃 pH 值升高。

4 离子载体

离子载体是某些放射菌发酵的产物,是一类含有某些阳离子的亲脂类化合物。它与金属离子形成螯合物,运送金属离子通过生物膜。离子载体主要抑制产生醋酸盐、甲酸、乳酸盐、氨气、氢气等的革兰氏阳性菌,对产生丙酸和琥珀酸的革兰氏阴性菌抑制作用不大。添加离子载体,能改变瘤胃发酵产物的生成量。增加丙酸产量,减少乳酸、氨气和甲烷的产量,抑制肽降解和氨基酸脱氨作用,提高瘤胃蛋白质生成量。国外研究较多的有莫能菌素等。莫能菌素是通过调节瘤胃发酵来促进动物生长的离

子载体。它可以改变瘤胃发酵的方向,改变丙酸与丁酸的产生比例。在体外试验中,通过在淀粉作为底物的培养基中加入莫能菌素可明显增加丙酸的产生量与摩尔比例,降低丁酸盐与甲烷的产量^[12]。叶均安等^[13]研究表明,添加莫能菌素能改变瘤胃的发酵方式,促进丙酸的合成,减少乙酸的生成。

5 脲酶抑制剂

脲酶是牛、羊等反刍动物瘤胃中一种包含镍离子的多亚基酶,能催化尿素分解成二氧化碳和氨。脲酶抑制剂是一类特殊的饲料添加剂,是用于降低脲酶活性的专用物质,可抑制反刍动物瘤胃中微生物脲酶活性,减缓尿素分解速度,使瘤胃微生物有平衡的氨氮供应,从而提高反刍动物对尿素的利用率^[14]。饲料中的蛋白质、非蛋白氮及内源尿素,在瘤胃中被降解为氨的速度部分取决于脲酶的活性。在饲料中添加脲酶抑制剂,使脲酶的活性得到抑制,氨的释放减慢,从而提高饲料中蛋白质和粗纤维的利用率,减少氨应激。石传林^[15]报道,饲喂脲酶抑制剂预混料的泌乳奶牛平均日产标准乳 18.18 kg/头。未添加饲喂的泌乳奶牛平均日产标准乳 16.4 kg/头,前者比后者提高产奶量 7.96%。叶日松等^[16]报道,奶牛饲喂脲酶抑制剂预混料后,奶牛采食量正常,平均每头日提高产奶量 0.84 kg,经济效益显著。脲酶抑制剂能有效地控制瘤胃内氨的爆发式释放,使氨较长时间稳定在一定的范围,不仅提高了氨的利用率,而且能提高粗饲料的利用率,从而达到提高奶产量的效果。

6 结语

瘤胃微生物在消化中占有重要地位,通过对其进行调控来改善饲料的消化具有重要意义,充分发挥瘤胃的消化效率以提高生产性能。目前,瘤胃发酵调控剂在生产实践中已取得了很好的效果,今后的研究可从以下方面考虑:(1)一些瘤胃调控剂的研究还只停留在表观上,对具体的机理还不清楚,要注重机理的研究。(2)要认识掌握瘤胃微生物的活动及代谢规律,全面实施瘤胃发酵调控,为开发新的调控剂打下基础。随着环保意识的增强,开发绿色饲料也将大大促进瘤胃调控剂的研发。

参考文献:

[1] 钱文熙,崔慰贤. 瘤胃发酵过程及其调控[J]. 宁夏农学院学

(下转第 17 页)

金属硫蛋白在动物生殖系统中的定位与调控研究进展

陈海燕¹, 张彬¹, 李丽立², 谭琼¹, 王莹¹

(1. 湖南农业大学特种经济动物研究所, 湖南长沙 410128; 2. 中国科学院亚热带农业生态研究所, 湖南长沙 410125)

摘要: 金属硫蛋白(MT)是一种在生物界广泛存在, 可被多种物质诱导产生, 功能独特的蛋白质。本文就金属硫蛋白的性质及其在动物生殖系统中的定位、诱导与调控的国内外研究进行综述。

关键词: 金属硫蛋白; 性质; 定位; 诱导; 调控
中图分类号: S816.79 **文献标识码:** A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0011-03

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一种广泛存在于生物界、低分子量、高金属含量、功能独特的蛋白质。各国科学家对MT进行了广泛的研究, 一些世界著名杂志也专门开辟了MT专栏, 迄今为止已召开了5届关于MT的国际会议(第五届MT国际会议于2005年10月8-12日在北京召开)。MT独特的生理功能包括抗氧化、抗应激、抗衰老、解除重金属毒性、补充微量元素、抗炎作用和抗肿瘤作用等。其理论和应用研究已涉及农业、医药、生物化学、分子生物学、环境科学、卫生毒理学、食品科学、营养学、保健科学和方法学等领域。

1 MT的理化性质

MT是一类低分子量、富含半胱氨酸(Cys)的金属结合蛋白质。1957年Margoshe和Valle首次在马肾中发现并分离出MT, 以后发现MT广泛存在于各种生物体中。1985年第二届国际MT会议提出, 被确认为MT的多肽具有以下几个与马肾MT相似的性质: 分子量低(通常少于10 000 Da), 金属含量高(通常4~12个金属离子/分子), 半胱氨酸含量高(有丰富的Cys-X-Cys三肽序列结构域), 缺乏芳香族氨基酸, 组氨酸含量极少。到1997年第四届国际MT会议上, 共发现并确定氨基酸序列的MT有170多种^[1]。MT是一个蛋白家族, 哺乳动物组织中通常含有MT-I、MT-II、MT-III和MT-IV四种异构体。其中, MT-I和MT-II广泛存在于机体各个组织中, 而MT-III(生长抑制因子)是大脑特异的成员, MT-IV仅发现在鳞状上皮

组织中。MT-III可以破坏培养的神经元的生存以及轴突的形成, 和其他MT成员几乎以同样的方式结合重金属(如Zn、Cu、Cd)。与其他成员不同的是: 该蛋白的生物学功能是作为生长抑制因子。该蛋白与Cu的结合能力明显高于MT-I和MT-II^[2]。

虽然MT分子中含有大量巯基, 但分子内、分子间均不存在二硫键。在自然条件下, 所有-Cys的巯基均与金属结合^[3], 并且可以与多种金属离子结合, 结合的稳定常数一般较大。但不同MT的解离常数因所含金属不同而异。MT的光吸收也与其所结合的金属种类有关, 据此可鉴定不同的MT^[1]。MT整个分子呈哑铃形, α 和 β 结构域通过第30、31位的残基(铰链区)相连。MT铰链区的存在使2个结构域存在较大的柔性和可变性, 从而使MT中的金属离子与溶液中的金属离子易于交换, 为其调节体内金属离子的代谢提供了结构基础^[4]。

MT具有热稳定性, 可耐受85℃ 10min不被破坏。MT的等电点为3.9~4.6, 在自然条件下MT通常带负电荷。

2 MT在动物生殖系统中的定位研究

2.1 雌性动物生殖道中

Nishimura等^[5]进行的MT在豚鼠的子宫、卵巢和乳腺中的定位研究表明: 在整个发情周期中, MT在子宫内膜的腺上皮都呈强阳性表达, 在单层柱状上皮呈弱阳性表达, 但在发情期MT在细胞质表达的阳性率有所下降。MT在卵巢的颗粒黄体细胞的细胞质和细胞核以及卵子的细胞质也都呈强阳性表达。在阴道上皮

细胞中细胞肠腔面的 MT 的表达在发情前期和发情期有所增加。在未怀孕的豚鼠乳腺组织中 MT 表达阳性率很高,但是在某些乳腺导管上皮细胞中呈散在性表达,而怀孕的豚鼠由于乳腺组织增生扩散,MT 着色也增加。因此,MT 与细胞的增殖和分化以及生殖激素可能存在至今未知的某种关联。

2.2 胎盘组织 马海燕等^[6]用免疫组化法检测 67 例围产期孕妇在低水平铅暴露时胎盘组织中 MT 的定位与表达时,MT 主要定位于胎盘组织的蜕膜细胞、滋养细胞及血管内皮细胞的细胞质中,并呈弥漫性或散在性分布。孙勇等^[7]检测湖北省某市的 140 位待产孕妇全血及其新生儿脐血、部分胎盘组织的镉水平和 MT 表达的试验表明:胎盘组织中的 MT 阳性表达率与母血镉水平 ($0.27\sim 13.00\ \mu\text{g/L}$) 呈正相关,而且胎盘镉水平波动在: $0.325\sim 1.69\ \mu\text{g/g}$ 干重,新生儿脐血镉水平波动在 $0.02\sim 2.69\ \mu\text{g/L}$,均极显著低于孕母血镉。因此,胎盘对镉具有明显的屏障作用可能与 MT 在胎盘组织中的高度表达有关。MT 也可能对胎盘组织结构的完整性和功能发挥具有重要作用。

2.3 睾丸和前列腺组织 MT 广泛分布于大鼠睾丸的各级生精细胞、精子和支持细胞^[8]。Cyr 等^[9]发现在正常生理情况下,大鼠睾丸组织 MT 水平高于其它组织如肝脏和肾脏。切除大鼠的睾丸后附睾中的 MT 呈雄性激素依赖性反应,而注射镉只能引起附睾始端 MT-I mRNA 水平及附睾始端和附睾头 MT-II mRNA 水平的升高,但是 MT-II mRNA 在附睾体的水平却降低了。金属镉虽然能够诱导睾丸 MT 的转录,却不能促进 MT 的合成^[10]。张莲英等^[11]用免疫组化染色测定将 MT 定位于 Wister 大鼠前列腺腺体上细胞核和细胞液中,各叶均为阳性,其表达强度依次为背侧叶>背前叶>腹叶,与锌、镉分布一致,且 MT 含量较少的前列腺腹叶对镉最敏感。曾祥斌等^[12]的研究再次证明了这一点。因此,在雄性动物生殖系统中 MT 主要受睾酮等雄性激素的调控,而 MT 在雄性动物生殖系统的高表达,表明 MT 可能对雄性动物维持生殖系统的正常生理功能发挥了重要的调节作用。

3 生殖系统中生殖激素对 MT 的诱导合成及其调控研究

3.1 睾酮 大鼠和小鼠生殖器官组织中 MT 的诱

导合成受到睾酮的调节^[13~15]。给大鼠注射睾酮可促进前列腺 MT mRNA 的表达^[16]。刘代成等^[17]的实验表明:睾丸切除后,家猫前列腺背叶、腹叶及尿道球腺内的 MT 分别下降至正常家猫的 21.2% ($P<0.01$)、88.4% ($P>0.05$) 和 18.5% ($P<0.01$)。睾丸切除后注射芝麻油,前列腺背叶及尿道球腺 MT 均未得到恢复。但若在睾丸切除后连续 3 d 注射 $10\ \mu\text{g/kg bw}$ (体重) 睾酮,两者依次恢复至 69.3% 和 59.4%。随睾酮注射剂量增加 (5、10、15、20、 $25\ \mu\text{g/kg bw}$),血浆睾酮的浓度、前列腺背叶及尿道球腺 MT 含量增高,即血浆睾酮与前列腺背叶及尿道球腺 MT 呈正相关 ($P<0.01$)。这些结果还表明,睾酮诱导前列腺背叶及尿道球腺 MT 的最适剂量为 $20\ \mu\text{g/kg bw}$ 。艾华等^[18]研究发现:营养性锌缺乏 (造成低睾酮大鼠模型) 不仅引起大鼠肝脏 MT 和锌含量明显降低 ($P<0.05$),而且导致急性力竭游泳 (大鼠游至连续 3 次沉入水下,每次超过 10 秒时认为力竭) 后肝脏 MT 峰值较晚出现。但不论锌营养状况如何,皮下注射睾酮均引起安静大鼠 (未实施力竭游泳的大鼠) 的肝脏 MT 含量显著性增高 ($P<0.05$),但在急性力竭游泳后 6 h 和 12 h,升高的幅度均低于未注射睾酮的对照组。因此,睾酮可以诱导 MT 的合成并且存在剂量关系。

3.2 雌激素 刘代成等^[19]用孕酮诱导家猫肝 MT 的实验结果发现:血清孕酮和肝 MT 之间呈正相关 ($P<0.01$),非妊娠期发情的雌猫血清孕酮和 MT 的含量随孕酮注射剂量的增加而升高,当注射剂量为 $12\ \mu\text{g/kg bw}$ 时肝脏 MT 合成接近最大;当注射孕酮剂量为 $18\ \mu\text{g/kg bw}$ 时,血清孕酮浓度为 $115\pm 14.5\ \mu\text{g/mL}$,肝 MT 含量仍然为 $450.5\pm 35\ \mu\text{g/kg}$,不再继续增加。妊娠家猫交配后第 3 天血清孕酮和肝 MT 开始升高,17~23 天维持在高峰状态,以后孕酮和肝 MT 下降,分娩后孕酮和肝 MT 迅速下降。以上结果说明在外源或内源孕酮诱导下,家猫肝 MT 合成有一个上限值,且利用孕酮诱导家猫肝 MT 的最合适剂量是 $12\ \mu\text{g/kg bw}$ 。

MT 是一类分布广泛的细胞内蛋白质,它存在于除结缔组织外的几乎所有哺乳动物的组织中。正常雌性动物生殖系统 MT 可能随生理周期中的激素水平变化而变化。Ioachim 等^[20]用免疫组化法测定了 32 例妇女正常子宫内膜,结果显示,

92.4%的分泌期内膜有MT表达,而增殖期内膜中MT阳性率仅为22.2%。同时测得MT在正常子宫内膜中的表达水平与雌、孕激素受体(ER、PR)呈负相关。范才等^[21]通过对64例浸润性乳腺导管癌女性患者MT及ER、PR表达的检测发现乳腺癌MT表达与ER、PR表达呈明显负相关。Espey等^[22]用RT-PCR法测得注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)24h后小鼠卵巢中MT mRNA的表达显著增加,并在注射后144h达至顶峰。另外,原位杂交结果显示,大多数MT-1 mRNA在排卵前后分别表达于卵泡内膜附近及黄体粒层细胞内,这些正是卵巢分泌激素的部位。这些结果均提示,MT的表达可能受雌性激素的调控。同时,MT也可能在动物的生殖或繁育过程中发挥了非常重要的调节作用。

4 展望

动物繁殖是动物世代得以延续、动物物种得以保存、动物产品得以生产的前提,如何提高动物的繁殖性能,是当前动物科学工作者的主要研究任务之一。由于抗生素的滥用已经给动物和人类的健康带来了很大的危害,各国的科学工作者都在积极寻找能够安全、高效地提高动物的生产性能和繁殖性能而性质又稳定的饲料添加剂产品,但都不尽如人意。MT在动物生殖系统中的高度表达意味着其在动物的繁殖过程中发挥了非常重要的作用,而且它性质稳定便于在生产中推广应用。但是目前关于MT的研究主要集中在实验动物和人的生殖肿瘤方面,对家畜家禽和特种经济动物繁殖性能的研究只见于本课题组张彬等^[23]在外源金属硫蛋白对奶牛抗热应激调控及SOD基因表达的影响的研究中,有测定Zn-MT对奶牛产奶性能的影响的报道。对MT的抗炎作用研究只在肝、肾和脾的少量报道,且作用机理不确定,而对于乳房炎、阴道炎等生殖道炎症的研究还未见有报道。进一步明确MT与生殖道炎症过程的关系将对预防和治疗动物的生殖道炎症有一定的参考价值;进一步明确MT在繁殖周期各阶段的作用和调控机理对于提高动物的繁殖性能以满足人们对动物产品的需求将有巨大的促进作用。

参考文献:

[1] 茹炳根. 第四届国际金属硫蛋白会议简介[J]. 生命科学, 1998,

10(3):157-158.

- [2] Toriumi S, Saito T, Hosokawa T, et al. Metal binding ability of metallothionein-3 expressed in *Escherichia coli*[J]. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2005, 96(4):295-301.
- [3] Binz P A, Kagi J H R. Metallothionein: molecular evolution and classification in metallothionein[C]. 4th International Metallothionein Meeting(MT-97). Basel: Birkhauser, 1999, 7-13.
- [4] Vallee B L. Introduction to metallothionein[J]. *Methods in Enzymology*, 1991, 205:3-7.
- [5] Nishimura N, Nishimura H, Tohyama C. Localization of metallothionein in female reproductive organs of rat and guinea pig[J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1989, 37(11):1601-1607.
- [6] 马海燕, 李红, 王教辰, 等. 妊娠期低水平铅暴露时胎盘组织中金属硫蛋白的表达[J]. *中华预防医学杂志*, 2006, 41(10):676-9.
- [7] 孙勇, 赵永成, 王继先, 等. 环境镉暴露时人胎盘组织金属硫蛋白表达及其意义[J]. *中国自然医学杂志*, 2005, 7(3):185-198.
- [8] Tohyama C, Nishimura N, Suzuki JS, et al. Metallothionein mRNA in the testis and prostate of the rat detected by digoxigenin-labeled riboprobe[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 1994, 101(5):341-346.
- [9] Cyr D G, Dufresne J, Pillet S, et al. Expression and regulation of metallothioneins in the rat epididymis[J]. *Journal of Andrology*, 2001, 22(1):124-135.
- [10] 任绪义, 周雍, 张建鹏, 等. 镉暴露大鼠睾丸支持细胞金属硫蛋白表达的时相研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2003, 31(6):965-968.
- [11] 张莲英, 陈蔚文, 李涵, 等. 锌、镉及金属硫蛋白在大鼠前列腺的定位研究[J]. *广东微量元素科学*, 1997, (10):10-16.
- [12] 曾祥斌, 金泰翼, 周袁芬. 经口镉染毒前列腺中金属硫蛋白基因表达水平的变化[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2002, 20(5):323-326.
- [13] Xiangbin Zeng, Taiyi Jin, Yuanfen Zhou, et al. Changes of serum sex hormone levels and MT mRNA expression in rats orally exposed to cadmium[J]. *Toxicology*, 2003, 186(1-2):109-118.
- [14] Tohyama C, Suzuki J S, Homma S, et al. Testosterone-dependent induction of metallothionein in germinal organs of male rats[J]. *Biochemical Journal*, 1996, 317(pt1):97-102.
- [15] Shimada H, Bare R M, Hochadel J F, et al. Testosterone pretreatment mitigates cadmium toxicity in male C57 mice but not in C3H mice[J]. *Toxicology*, 1997, 116(1-3):183-191.
- [16] Chalak S, Oliveria P, Kaplan P, et al. Expression and regulation of metallothionein mRNA levels in the prostates of noble rats: lack of expression in the

ventral prostate and regulation by sex hormones in the dorsolateral pruslate[J]. Prostate, 1996, 29(2): 91-100.

[17] 刘代成, 原永洁. 睾酮对雄家猫附性器官金属硫蛋白的诱导[J]. 生理学报, 1999, 51(1): 111-114.

[18] 艾华, 周先碗, 茹炳根, 等. 睾酮对大鼠肝脏金属硫蛋白诱导合成的作用[J]. 中国运动医学杂志, 2001, 20(2): 121-125.

[19] 刘代成, 原永洁. 孕酮对家猫金属硫蛋白的诱导[J]. 动物学报, 1998, 44(3): 375-376.

[20] Ioachim E E, Kstsiou E, Carassavoglou C, et al. Immunohistochemical localization of metallothionein in endometrial lesions[J]. Journal of Pathophysiology, 2000, 191: 269-273.

[21] 范才, 贺战国, 成继民, 等. 金属硫蛋白、雌激素受体和孕激素受体在乳腺癌中的表达及相关性研究[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2003, 10(5): 390-392.

[22] Espey L L, Ujioka T, Okamm H, et al. Metallothionein- I messenger RNA transcription in steroidsecreting cells of the rat ovary during the periovulatory period[J]. Biology of Reproduction, 2003, 68: 1895-1902.

[23] 张彬, 薛立群, 李丽立, 等. 外源金属硫蛋白对奶牛抗热应激调控及 SOD 基因表达的影响[J]. 应用生态学报, 2007, 18(1): 193-198.

热烈祝贺广东省动物育种与营养公共实验室顺利通过验收

2008年5月14日,广东省科技厅组织验收专家组,对以广东省农业科学院为依托单位的“广东省动物育种与营养公共实验室”建设项目进行了为期一天的验收。验收专家组由来自中山大学、中国农业大学、华南农业大学、暨南大学、华南师范大学、广东省微生物研究所、广省测试分析研究所专家组成,中山大学陈瑶生教授和中国农业大学谯仕彦教授分别担任组长和副组长。广东省科技厅刘庆茂副巡视员、条件财务处卢金贵处长、陈菊玉调研员等领导出席了验收会议。验收专家组听取了实验室主任蒋宗勇研究员的建设汇报,现场考察了实验室建设情况,审阅核对了验收报告和相关材料,并专门与实验室科技骨干进行了座谈。

广东省动物育种与营养公共实验室于2004年12月正式批准立项建设。建设期间,实验室紧密结合我省动物养殖业研究开发和产业需求中的重大问题,整合依托单位的优势方向,形成了动物种质资源创新利用与遗传育种、动物营养代谢调控、饲料新资源及利用的新技术、动物产品品质改良与安全评价等4个研究领域,研究方向明确、研究内容特色鲜明,能够为广东省动物养殖业及相关产业提供关键共性技术和支撑服务。在建设期间实验室承担863计划、国家自然科学基金、“十一五”国家支撑计划、948重大专项、农业公益性行业科研专项、广东省自然科学基金团队、产学研战略联盟等86项国家和省部级科技计划项目,取得了一批已进入实际应用的高水平成果,获得了10项省部级奖励和3项专利成果。尤其是在优质鸡和猪鸡营养及饲料添加剂开发与应用方面成绩显著。通过自身队伍建设和人才引进,实验室已初步形成了一支结构合理、稳定,总体研发能力强,在国内具有特色的动物育种及营养研究团队。实验室规章制度齐全,管理规范,创新环境好。

专家组充分肯定了实验室建设期所取得的成绩,认为该实验室建设期研究方向明确、发展定位准确,在研究方向凝炼、人才队伍建设、研究水平提升、科研成果产出、基础条件建设与实验室管理等方面达到了预期的建设目标,一致同意通过建设验收。刘庆茂副巡视员做了总结讲话,充分肯定了广东省动物育种与营养公共实验室建设期间在基础条件建设、人才培养、技术服务与支撑等方面取得的进步与成绩,对公共实验室下一步的建设、发展方向和目标提出了更高的期望。(信息来源:广东省农业科学院畜牧研究所 陈晓明 供稿)

猪脑心肌炎

严安毓, 陈金闫, 王 燕

(山东省青岛宝依特生物制药有限公司, 山东 青岛 266114)

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0015-03

猪脑心肌炎是一种由脑心肌炎病毒(Encephalomyocarditis virus, EMCV)引起的猪的一种以脑炎、心肌炎或心肌周围炎为主要特征的急性传染病,给养猪业造成了极大的损失^[1]。本文对猪脑心肌炎流行病学、病原学、临床症状、病理变化、诊断和防制等方面进行了综述。

1 流行病学

1945年从佛罗里达州一只患急性致死性心肌炎的黑猩猩体内首次分离到该病毒。1958年,猪脑心肌炎病毒作为仔猪致死性心肌炎的病原首次被报道^[2]。随后,本病曾多次在美国、巴拿马、比利时、意大利、澳大利亚、韩国等地的猪群中暴发流行,造成了严重的经济损失。

我国对EMCV及其所致疾病的研究工作还处于起步阶段。张家龙等^[3]应用酶联免疫吸附试验(ELISA)对2005-2006年间采集自全国13个省市46个规模化猪场的3250份血清样本进行了EMCV抗体检测,结果显示,各省阳性率在39.64%~90%之间,平均抗体阳性率为72%;监测的46个猪场都存在EMCV感染,猪场感染阳性率为100%。盖新娜等^[4]2007年首次从我国北京、河北、湖北、天津、辽宁5个地区的规模化发病猪场分离到5株EMCV,从病原学上揭示了我国猪群中EMCV感染的存在。调查结果表明,我国规模化猪场已经普遍感染EMCV,这应引起我国养猪业警惕,并做好该病的综合防控准备。

EMCV感染可引起仔猪或母猪发病。仔猪主要表现为致死性心肌炎,急性死亡率最高可达100%;怀孕母猪表现为流产、产死胎、弱胎、木乃伊胎,但通常不发生死亡;成年猪多呈隐性感染。本病可通过胎盘垂直传播。EMCV在自然界中存在广泛的宿主,除了可以感染猪、鼠、牛、马、大象甚至

蚊子等在内的多种动物,还包括猴、黑猩猩和人等灵长类动物。该病给人类健康带来一定的隐患,因此,猪脑心肌炎病毒的公共卫生学意义值得关注。实验感染猪死亡后,可以从许多器官分离到病毒,但以心肌含毒量最高,肝、脾次之。EMCV不同毒株毒力及致病性相差很大。

2 病原学

2.1 EMCV的基本生物学特征 猪脑心肌炎病毒是引起猪脑心肌炎的病原体,属于小RNA病毒科(Picornaviridae)心病毒属(Cardiovirus)。病毒粒子核衣壳为对称的二十面体,直径约为30nm,呈圆形,有囊膜,分子量约 2.6×10^3 KDa,在氯化铯中的浮密度为 $1.33 \sim 1.34$ g/cm³。蛋白衣壳由60个衣壳粒子组成,每一个衣壳粒子由4种结构蛋白VP1、VP2、VP3和VP4组成。EMCV只有一个血清型,但抗原性存在差异;具有血凝性,可凝集绵羊红细胞,这种凝集作用可被特异性免疫血清所抑制。本病毒能抵抗乙醚、氯仿、乙醇等脂溶剂,然而电离辐射、酚和甲醛可使此病毒失去活性。在pH 3.0条件下稳定,-70℃可长期保存,60℃ 30min可被灭活。

EMCV可在鼠胚成纤维细胞、仓鼠细胞系BHK-21以及猪源和人源的原代肾细胞和许多细胞系中增殖,并迅速产生明显的细胞病变。EMCV还能在鼠和鸡胚中复制,对多种动物均有致病性。动物感染后,病毒血症持续时间较短,一般为2~4d,而且在感染早期体内即出现较低滴度的中和抗体,一旦中和抗体出现就会降低病毒的分离成功率。

2.2 EMCV基因组及其所编码的蛋白 EMCV的基因组为带PolyA尾的单股正链RNA,基因组全长约7.8kb,含有一个较大的开放阅读框,编码的聚

合蛋白被自身编码的蛋白酶水解成4个结构蛋白(VP1、VP2、VP3、VP4)和7个非结构蛋白(2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D)。两端存在有5'和3'非编码区。在近5'端有Poly(C),长度约50~150nt。VP1蛋白位于病毒粒子的最表面,是EMCV结构蛋白中免疫原性最强的抗原蛋白,可刺激机体产生中和抗体。Zhang等^[5]首次测定了我国BJC3和HB1两个分离株的全基因序列,基因组全长分别为7 746 bp和7 735 bp。通过分析表明各分离株核苷酸与氨基酸之间具有高度的相似性。BJC3和HB1的两个分离株与BEL-2887A/91、EMCV-R和PV21株之间的相似性为92.5%~99.6%,而与Mengo、EMC-B、EMC-D及D变异株之间的相似性为81.0%~84.6%。表明不同地区分离的EMCV毒株其核苷酸序列差异较大,但基因组结构基本相似。

3 临床症状及病理变化

临床上猪脑心肌炎主要侵害仔猪。最急性型表现为同胎或同窝仔猪常在几乎看不到任何前期症状的情况下突然死亡,或经短时间兴奋而虚脱死亡。急性型发作的病猪可见短时间的发热(41~42℃)、精神沉郁、减食或停食,有的猪表现震颤、步态蹒跚、呕吐、呼吸困难等症状,往往在吃食、抓猪、驱赶兴奋时由于心力衰竭突然倒地死亡。

剖检可见到胸、腹部皮肤发绀,胸、腹腔和心包积液,并含有少量纤维蛋白。心脏软而苍白,明显的心肌炎和心肌变性,心肌有不连续的白色或灰黄白色区,在灶性病变上可见白垩中心,或在弥散区域有白垩斑点。肝充血,轻度肿胀。肺常见充血和水肿。脑膜轻度充血或正常。组织学检查,最显著的变化为心肌炎。可见心肌充血、水肿和心肌纤维变性、坏死,淋巴细胞、巨噬细胞浸润。坏死的心肌有无机盐沉着、钙化。心肌层的渗出液中有嗜酸性细胞浸润。脑膜充血和轻度炎症,脑可见点状神经元变性区。

4 诊断与防制

4.1 EMCV 的诊断 根据临床和病理变化,用病死猪的心脏剪碎饲喂小鼠,在4~7d内死亡,可做出初诊。目前,血清学方法有病毒中和试验(SN)、血凝抑制试验(HI)、琼脂凝胶沉淀试验(AGP)以及酶联免疫吸附试验(ELISA)等许多方法,每一种方法都有各自的优缺点。韩研妍等^[7]人工合成一段

VP1抗原表位的基因序列(150 bp),克隆于原核表达载体pGEX-6p-1上,转化BL21大肠杆菌中获得了正确表达,纯化后的蛋白具有抗原性。盖新娜等^[6]利用原核表达系统成功表达出EMCV的VP1蛋白,Westerln Blotting分析表明表达的重组VP1蛋白可与EMCV抗血清发生特异性结合反应;董昕欣等^[8]利用原核表达的EMCV VP1重组蛋白免疫小鼠制备单克隆抗体。随着EMCV单抗的研制成功,酶联免疫吸附试验成为一种重要的检测方法,为血清学诊断与特异敏感检测方法的建立以及开展国内规模化猪场猪脑心肌炎的血清学调查奠定了基础。检测猪脑心肌炎病毒抗体可以确定猪是否感染了猪脑心肌炎病毒。但在感染初期,未产生特异的EMCV抗体,或是抗体滴度低时,利用上述方法检测不到EMCV抗体,因此,不利于该病的早期诊断。

病原学诊断对于EMCV感染的确诊十分必要。病毒的分离鉴定,是最可靠、最经典的方法,但它耗时费力。Vlemmas等^[9]建立了免疫组织化学方法,可以检测心脏、脾、胰腺等组织中的病原体,但制备病理组织样品比较麻烦、耗时;Meng等^[10]建立了放射性探针原位杂交技术,但具有放射污染性,而且操作冗长。PCR技术因具有简便、快速、敏感性高和特异性强的优点,已广泛应用于微生物检测、疫病诊断等诸多领域。Vanderhallen等^[11]和Kassimi等^[12]分别建立了EMCV RT-PCR的快速检测方法;Yang等^[13]还建立了EMCV的实时定量荧光PCR的检测方法,该方法具有敏感、特异、快速和定量的特点。

4.2 EMCV 的防制 目前国内对猪脑心肌炎尚无有效的治疗药物和疫苗,主要靠综合性防制措施加以预防。首先应当注意防止野生动物,特别是啮齿类动物偷食或污染饲料与水源。如发现可疑病猪时,猪群应立即隔离消毒,病死猪要迅速做无害化处理,被污染的圈舍场地应以含氯消毒剂彻底消毒。尽量避免使猪产生应激反应,可使猪的病死亡率降低。

我国对EMCV的研究起步较晚,在疫苗方面的研究几乎空白,而该病已对我国养猪业造成威胁。赵东升等^[14]经蚀斑筛选获得的EMCV BJC3纯化毒株对BHK-21细胞具有较好的适应性,能够在短时

间内迅速增殖, 达到较高的病毒滴度, 25 代内的病毒滴度均保持在 10⁻⁸~3TCID₅₀/0.1 mL 左右, 为猪脑心肌炎灭活疫苗的研制和生产奠定基础。

参考文献:

- [1] Straw B E, D' Allaire S, William L, et al. Diseases of Swine[M]. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press, 1999. 139-144.
- [2] Murnane T G, Craighead J E, Mondragon H, et al. Fatal disease of swine due to encephalomyocarditis virus [J]. Science, 1960, (131): 498-499.
- [3] 张家龙, 盖新娜, 马良, 等. 规模化猪场脑心肌炎病毒感染的血清学调查[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(1): 7-9.
- [4] 盖新娜, 杨汉春, 郭鑫等. 猪脑心肌炎病毒的分离与鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(1): 59-65.
- [5] Zhang G Q, Ge X N, Guo X, et al. Genomic analysis of two porcine encephalomyocarditis virus strains isolated in China[J]. Arch virol, 2007, 152(6): 1209-1213.
- [6] 盖新娜, 杨汉春, 郭鑫, 等. 猪脑心肌炎病毒结构蛋白 VP1 基因的克隆与原核表达[J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(11): 9-11.
- [7] 韩研妍, 姜平, 顾小雪, 等. 人工合成的脑心肌炎病毒 VP1 表位基因在大肠杆菌中的表达与抗原性测定[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(4): 100-103.
- [8] 董昕欣, 郭鑫, 杨汉春, 等. 猪脑心肌炎病毒 VP1 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(01): 24-28.
- [9] Vlemmas J, Billinis C, Psychas V, et al. Immunohistochemical detection of encephalomyocarditis virus (EMCV) antigen in the heart of experimentally infected piglets[J]. J Comp Pathol, 2000, 122(4): 235-240.
- [10] Meng X J, Paul P S, Vaughn E M, et al. Development of a radiolabeled nucleotide probe for the detection of encephalomyocarditis virus infection in swine [J]. J vet Diagn Res, 1993, (5): 254-258.
- [11] Vanderhallen H, Koenen F. Rapid diagnosis of encephalomyocarditis virus infections in pigs using a reverse transcription polymerase chain reaction [J]. J Virol Methods, 1997, 66(1): 83-89.
- [12] Kassimi L B, Gonzague M, Boutrouille A, et al. Detection of encephalomyocarditis virus in clinical samples by immunomagnetic separation and one-step RT-PCR[J]. Virol Method, 2002, 101(1-2): 199-206.
- [13] Yang D K, Kweon C H, Kim B H, et al. TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of Japanese encephalitis virus[J]. J Vet Sci, 2004, 12, 5(4): 345-351.
- [14] 赵东升, 郭鑫, 杨汉春等. 猪脑心肌炎灭活疫苗的研究——猪脑心肌炎病毒种毒纯化及其生物学特性[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(5): 8-10.
- [15] 胃发酵特性的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2006, (9): 37-39.
- [10] Martin S A, Nisbet D J, Dean R G. Influence of a Commercial Yeast Supplement on the in Vitro Ruminant Fermentation[J]. Nu2tr Rep Int, 1989, (40), 395-403.
- [11] Williams P E V, Tait C A, Ines G M, et al. Effects of the Inclusion of Yeast Culture (Saccharomyces Plus Growth Modium) in the Diet of Dairy Cows on Milk Yield and Forage Degradation and Fermentation Patterns in the Rumen of Steers[J]. J Anim Sci, 1991, 69: 3016-3026.
- [12] Marounek M, Fievez V, Mbanzamihiho L, et al. In vitro effects of bacitracin and monensin on ovine rumen fermentation[J]. Sci Agric Bohemica, 2001, 33(2): 59-62.
- [13] 叶均安. 莫能菌素添加剂对瘤胃培养物发酵的影响[J]. 饲料研究, 2003, (6): 39.
- [14] 常巧玲, 孙建义. 脲酶抑制剂在奶牛营养中的研究与应用[J]. 饲料与畜牧, 2006, (3): 38-40.
- [15] 石传林. 脲酶抑制剂预混料饲喂泌乳奶牛效果试验[J]. 粮食与饲料工业, 2002, (2): 34-35.
- [16] 叶日松, 谢仕荣, 张均强. 反刍动物专用预混料脲酶抑制剂饲喂奶牛试验[J]. 中国草食动物, 2003, 23(5): 29-30.

(上接第 10 页)

报, 2004, 25(1): 61-64.

- [2] 刘亚轩, 熊家军. 饲料调控剂在奶牛饲料中的作用[J]. 湖北畜牧兽医, 2003, (3): 55-56.
- [3] 王全军, 毛胜勇, 张红霞, 等. 半胱胺对山羊瘤胃微生物体外发酵的影响[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(6): 535-539.
- [4] 刘宗柱, 王金宝, 徐德武, 等. 人工瘤胃中半胱胺的稳定性及其对瘤胃发酵的影响[J]. 畜牧兽医学报, 1998, 29(61): 513-516.
- [5] Ryan J P, Leek B F. Effect of yucca schidigera and its mechanism of action in reducing ammonia levels in a biologically filtered environment[J]. J Anim Sci, 1993, 71(suppl 1): 91.
- [6] Girard. Fermentations in rumen-stimulating cultures receiving yucca extra supplementation[J]. J Anim Sci, 1991, 9(suppl 1): 498-500.
- [7] 苑文珠. 茶皂素对湖羊生产性能及瘤胃发酵的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2002.
- [8] 张元庆, 肖训军, 孟庆翔. 毛茛科植物提取物添加量对瘤胃微生物体外动态发酵的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2007, 43(5): 27-31.
- [9] 唐海翠, 庞学东, 庄苏, 等. 高精料条件下酵母培养物对山羊瘤

乳酸杆菌的研究进展及其在畜牧业上的应用

赵艳平¹, 李建喜², 黄小红¹, 武 帅¹

(1. 江西农业大学动物科技学院动物营养实验室, 江西 南昌 330045; 2. 江西省家畜血吸虫防疫站, 江西 南昌 330046)

中图分类号: S852.69

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0018-02

近年来,随着微生物生态学的迅速发展,微生态制剂作为免疫赋活剂在防治疾病方面越来越受重视^[1]。乳酸杆菌作为主要的益生菌已广泛应用于食品及饲料加工业,在功能食品、医疗保健、微生态制剂等领域的应用具有诱人的前景^[2]。

1 乳杆菌属的细菌形态及培养特性

乳杆菌属(*Lactobacillus*)菌体通常呈细长的杆状,一般大小为0.5~1.0 μm宽,2.0~10.0 μm长,无芽胞和荚膜,周身鞭毛或无鞭毛,通常不运动。革兰氏染色阳性,为微好氧或厌氧。发酵产生乳酸,最适生长pH值为4~6。目前,已从哺乳动物粪便、阴道分泌物、奶酪、酸菜等分离到40多种乳酸杆菌,它们共同属于乳酸杆菌属。

2 乳酸杆菌的作用机理

乳酸杆菌不仅可以改善机体代谢,促进畜禽生长,提高畜禽的生产性能,还可以改善动物健康水平,预防疾病及提高动物免疫力。其基本的作用机理主要有以下几个方面。

2.1 生物拮抗作用。主要表现在对营养素的竞争、对吸附部位的竞争、pH的改变、细菌素及抗生性物质的产生等方面,从而抵抗致病菌群的生存、繁殖以及在消化道内的定居和附着。

2.2 维持肠道菌群的微生态平衡。在健康动物的肠道中,存在大量的微生物菌群,各种菌群的种类、数量和定居部位是相对稳定的,它们相互协调,互相制约,保持着相对平衡,共同形成一个微生态系统,维持着动物的生长和生产。动物摄入乳酸杆菌后,通过乳酸杆菌在消化道的粘附和定植,使消化道内的有益菌群得到了有效补充,使优势菌群在数量上和作用强度上占绝对优势,可以达到恢复宿主抵抗力,修复肠道菌群屏障,治愈肠道疾病的作用。

2.3 增强肠道上皮细胞的屏障层,从而阻止病原穿越上皮细胞。乳酸杆菌在消化道内生成致密性膜菌群,形成微生物屏障,且乳酸杆菌具有促进上皮细胞修复功能,既能抑制消化道粘附病原菌、中和毒性产物、防止毒素和废物的吸收,又可提高上皮细胞对病原的抗侵袭力。

2.4 提高动物免疫功能。很多报道证明乳酸杆菌可以间接地增强自身免疫系统的功能,特别是可以增强巨噬细胞的吞噬功能。上皮细胞抵御系统对乳酸杆菌也有应答作用。Kabir报道乳酸杆菌虽然不能降低上皮细胞L-8的产生,但可以粘附于胃上皮细胞从而阻止L-8。乳酸杆菌可以刺激获得性免疫系统,包括激活淋巴细胞及抗体的产生。

2.5 降低胆固醇。乳酸杆菌的代谢能显著减少肠管对胆固醇的吸收,从而导致机体血清中胆固醇的含量下降。同时乳酸杆菌吸收部分胆固醇并将其转变为胆酸盐排出体外。

3 乳酸杆菌在畜牧生产及人类疾病治疗方面的应用

目前,乳酸杆菌制剂已被应用于肠道的微生态治疗^[3]。乳酸杆菌另一个在医学领域具有应用潜力的是作为免疫接种的疫苗载体^[4-6]。乳酸杆菌是健康妇女阴道正常菌群中优势菌^[7]。有实验证明乳酸杆菌有免疫增强作用,可提高机体巨噬细胞的吞噬功能,对妇女阴道炎的发病有非常重要的生物拮抗作用^[8,9]。

3.1 乳酸杆菌对家畜的影响 乳酸杆菌是猪消化道前段的优势菌群,能抑制肠道腐败菌活动。乳酸杆菌产生的乳酸能够降低pH值,抑制其它微生物生长。消化道中乳酸杆菌的数量、种类和位置对于预防和控制疾病具有重要作用。

3.1.1 乳酸杆菌对断奶仔猪生长性能、养分表现

消化率和消化酶活性的影响。乳酸杆菌是猪肠道正常菌群中重要的优势菌之一,对改善肠道内环境、维持猪体内正常的微生态平衡,具有十分重要的意义。但韩春艳等^[10]研究认为,乳酸杆菌对2周龄以上的仔猪没有表现出良好的促生长作用。在断奶仔猪日粮中添加乳酸杆菌显著提高断奶仔猪体重、日增重和饲料转化效率,与未添加组相比,仔猪平均日增重提高了32.1%,表现出良好的促生长效果。乔宏宇等^[11]认为,仔猪处于应激期时使用活菌制剂的促生长效果最好。Kahraman等^[12]研究认为,微生态制剂与抗生素配伍的效果,优于单一添加微生态制剂,体现出了二者的协同作用。Collington^[13]认为,日粮中添加乳酸杆菌可显著提高仔猪小肠内容物中的碳水化合物酶活性,乳酸杆菌在细胞内外均可产生淀粉酶。添加乳酸杆菌可显著提高断奶仔猪胰脏和十二指肠食糜中淀粉酶和脂肪酶的活性,提高平均日增重和饲料粗脂肪表观消化率。据此认为,日粮中添加乳酸杆菌后,仔猪生长性能的提高与仔猪脂肪酶活性和粗脂肪表观消化率的提高有关。

3.1.2 乳酸杆菌可以预防并治疗腹泻。Red-mend 1968年报道,乳酸杆菌经口饲喂仔猪可以减少下痢、改善发育。Muralidhara报道,给刚出生的仔猪饲喂乳酸杆菌可以减少大肠杆菌数量,粪便中乳酸杆菌与大肠杆菌的比例达到1280:1,而未饲喂乳酸杆菌组的比例为2:1,此比例的提高可以保护动物抵抗肠致病性大肠杆菌的侵袭,预防腹泻。

3.2 乳酸杆菌对家禽的影响鸡肠道黏膜上皮细胞表面及其周围黏附有大量的乳酸杆菌。乳酸杆菌对鸡小肠黏膜上皮细胞的黏附,可以在小肠黏膜的表面形成屏障,阻碍其他细菌特别是有害菌与小肠黏膜上皮细胞的接触,降低了有害菌通过肠道侵染鸡体的机会。至于乳酸杆菌对鸡肠道黏膜上皮细胞的黏附,是随机的还是通过特异性受体介导的,需进一步研究证实^[14]。

3.3 乳酸杆菌对人类的影响乳酸杆菌能够抑制人体某些肿瘤的发生发展。流行病学调查发现,长期食用酸奶制品可降低乳腺癌、结直肠癌、胃癌及膀胱癌^[15]的发生率。Budagov等^[16]发现,放化疗前应用嗜酸乳杆菌可保护造血干细胞,使内源性脾脏集落形成单位提高3.4~6.7倍,减轻由放化疗所致的骨髓抑制或白细胞减少,同时不影响放

化疗效果。乳酪乳杆菌对乳腺癌MCF7细胞生长有抑制作用^[17];从人粪便分离的2种乳酸杆菌(HN1和HA8)对骨髓瘤细胞有很强的抑制增殖作用^[18]。临床应用,乳酸杆菌主要与其他治疗手段相结合,可增强疗效,降低副作用。Seow等^[19]发现,乳酪乳杆菌9018株(UC9018)与鼠李糖乳酪乳杆菌联合使用,对人膀胱癌MGH-RT112细胞系的抑制生长作用强于卡介苗,应用乳酪乳杆菌灌注治疗膀胱癌比卡介苗更安全有效。在体外实验中,嗜酸乳杆菌等多种乳酸杆菌可阻止幽门螺杆菌在哺乳类动物上皮细胞粘附,并能抑制白介素-8释放;体内实验结果显示,乳酸杆菌能够有效预防幽门螺杆菌感染,并且对于其感染有一定治疗作用^[20]。由于幽门螺杆菌感染可导致胃癌前病变发生,故乳酸杆菌对其拮抗作用,可降低胃癌发病率。

4 乳酸杆菌的应用前景

益生菌具有无污染、无药物残留、不产生耐药性等优点,符合可持续发展要求。乳酸杆菌制剂作为一种益生菌,已被许多的实验研究及实际应用证实了它是动物消化道中的正常益生菌,能形成正常菌丛,对动物无任何致畸和不良反应,而且乳酸杆菌可通过生物拮抗、改善动物肠道的生态环境及提高动物免疫力等机制发挥其益生菌的作用,已被广泛地应用于动物生产中。乳酸杆菌微生态制剂作为一种优质的环保生态产品,应用前景广阔。

参考文献:

- [1] 任月,袁杰利. 乳酸杆菌及其免疫治疗作用研究进展[J]. 中国微生物学杂志, 2005, 17(5): 392.
- [2] 胡东兴,潘康成. 微生态制剂及其作用原理[J]. 中国饲料, 2001, (3): 14-16.
- [3] 金礼琴,孙玲. 微生态制剂的合理应用[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(6): 98-100.
- [4] Peter H, Pouwels, Rob J, et al Lactic acid bacteria as antigendelivery vehicles for oral immunization purposes[J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, (41): 155-167.
- [5] Eva Medina, Alberto Guzman. Use of live bacterial vaccine for antigen delivery: potential and limitations[J]. Vaccine, 2001, (19): 1573-1580.
- [6] Jos F M L, Seegers. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects[J]. Trends in Biotechnology, 2002, (20): 508-515.
- [7] 任力,葛凤霞,袁小林. 乳酸杆菌对小鼠巨噬细胞受体介导内吞及抗肿瘤作用的研究[J]. 吉林医学院学报, 1999, 19(1): 19-21.

(下转第21页)

宝饲迪对肉鸡生产性能的影响

陈志虹¹, 张涛¹, 孔德胜¹, 郭世宁²

(1. 广东省农科集团前沿动物保健有限公司, 广东 广州 510640; 2. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 将200只岭南黄鸡随机分成5组, 空白对照组鸡只喂基础日粮, 西药组在基础日粮中添加0.04%的杆菌肽锌, 其它三组分别在基础日粮中添加0.2%、0.5%和0.8%的宝饲迪(酪酸菌制剂)。结果表明: 中、低剂量宝饲迪组在增重和存活率方面比对照组均有明显的提高; 添加0.5%宝饲迪的试验组效果较为明显, 增重比对照组提高10.3%, 比西药组提高9.4%, 料肉比为1.94。

关键词: 宝饲迪; 岭南黄鸡; 生长; 影响

中图分类号: S831.49

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0020-02

近年来,我国养禽业在飞速发展的同时,也出现了一些问题。为提高生产效益而不顾及饲养环境,致使饲养环境不断恶化,各种疾病不断发生,损失惨重。抗生素的过量使用破坏动物肠道内的微生物平衡,增强了动物特别是幼龄动物对病原微生物的易感性,增加消化道疾病的发生几率;抗生素的长期使用会产生耐药菌株,导致动物机体免疫功能下降;滥用抗生素还可破坏生态环境。不少国家已经从法律上禁止抗生素作为饲料添加剂使用。因此,微生态制剂替代抗生素作为饲料添加是大势所趋。

益生菌(Probiotics)是近年来国内外研制的一类微生态制剂。因其具有调节肠道功能、维持肠道内菌群平衡和提高机体健康水平及生产性能、避免服用抗生素带来的耐药性和二重感染等问题的优点,已广泛地应用于医疗、保健、食品、畜牧和水产等行业。酪酸菌(*Clostridium butyricum*)即丁酸梭菌,是1933年由日本千叶医科大学宫入近治博士首先发现并报告的,因此又名宫入菌。酪酸菌制剂能够在数量或种类上补充肠道内的正常微生物菌群,调整或维持肠道内微生态平衡;在动物肠壁上定植,形成生物保护屏障,并产生有机酸,降低肠道pH值,发挥生物拮抗作用,从而抑制病原微生物的繁殖;提高动物体内的免疫球蛋白和巨噬细胞活性,从而增强动物机体免疫功能,增强抗病能力;产生多种酶类和维生素,提高动物对饲料的利用率。

本试验将宝饲迪(酪酸菌制剂)在肉鸡基础日粮中添加,不再使用药物保健,研究其对肉鸡生产性能的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料 宝饲迪(酪酸菌制剂)为广东省农科集团前沿动物保健有限公司自行研制的实验室产品,试制批号:20070201,制剂中酪酸菌含量大于 5.0×10^8 cfu/g。

1.2 试验日期及地点 本试验于2007年4月2-29日在广东省农业科学院兽医研究所进行。

1.3 试验动物及分组 试验选择出生重相近的1日龄岭南黄鸡200只,随机分成5组,每组40只。A组为空白对照组,只喂基础日粮,不添加任何添加剂;B组为添加0.04%杆菌肽锌组;C、D、E组为试验组,分别在日粮中添加0.2%、0.5%和0.8%的宝饲迪。

1.4 饲养管理 自由采食和饮水,自然通风,白天自然光照,晚上补充灯光照明。饲养管理按常规进行。

1.5 测定指标 记录出生重,并测定记录第28天的增重情况、耗料量和鸡只死亡情况。

2 试验结果与分析

2.1 增重情况 各组鸡只的平均增重情况见表1。由表1可以看出,饲喂28天,中、高剂量组(D、E组)的平均增重分别比空白对照组(A组)提高10.3%、6.7%,差异显著。D、E组的平均增重分别比杆菌肽锌组(B组)提高9.4%和5.7%,差异显著,

而低剂量组(C组)与A、B组相比差异不显著。

表1 各组鸡只的平均增重情况

组别	始重(g)	末重(g)	增重(g)
A	44.05	497.93	453.88 ^{ad}
B	45.12	502.92	457.80 ^a
C	44.35	500.19	455.84 ^a
D	43.24	543.88	500.64 ^b
E	45.08	529.20	484.12 ^b

1): 同列数据肩标字母相同表示差异不显著($P > 0.05$), 相邻字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

2.2 料肉比 各组的料肉比情况见表2。从表2中可以看出, D、E组肉鸡料肉比比A组分别降低7.6%、7.1%, 差异显著。D、E组肉鸡料肉比比B组分别降低5.4%、4.9%, 差异显著。C组与A、B组相比差异不显著。

表2 各组鸡只的料肉比

组别	耗料(g/只)	增重(g/只)	料肉比
A	953.15	453.88 ^a	2.10 ^a
B	938.49	457.80 ^a	2.05 ^a
C	916.24	455.84 ^a	2.01 ^a
D	971.24	500.64 ^b	1.94 ^b
E	944.03	484.12 ^b	1.95 ^b

2.3 死亡情况和成活率 到4周龄为止, 各组鸡只的死亡情况和成活率如表3。从表3的结果可以看出, C、D、E组和A、B组相比, 成活率有所提高。

表3 各组鸡只的死亡情况及成活率

组别	死亡数(只)	存活数(只)	成活率(%)
A	3	37	92.5
B	3	37	92.5
C	2	38	95.0
D	1	39	97.5
E	2	38	95.0

3 讨论

宝饲迪对肉鸡有明显的促生长作用, 并且可以明显提高饲料转化率, 效果优于杆菌肽锌。这可能与宝饲迪改变肠道微生态环境有关。近年来微生态制剂已被广泛应用于养殖业, 如乳酸菌、芽孢杆菌等, 并取得理想的效果。而酪酸菌作为添加剂用于饲料中的报告则相对较少, 本试验的结果也表明酪酸菌可以作为一种新型的微生态制剂, 但对其作用机理、工艺流程、产品标准, 还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 黄文江. 天然中草药产品——全面替代抗生素生长促进剂的理想选择[J]. 中国家禽, 2006, 28(13): 58.
- [2] 王保正, 杨清付, 董晓东等. 酪酸菌对猪生长特性的影响[J]. 饲料工业, 2007, 28(16): 39-40.
- [3] 庄志发, 贺连智, 冯紫慧. 简述微生态活菌(酪酸菌)制剂的研究应用[J]. 山东食品发酵, 1999(1): 32-35.

(上接第19页)

- [8] 马秀英. 阴道乳酸杆菌在细胞性阴道病诊断中的意义[J]. 临床医药实践杂志, 2004, 13(2): 121.
- [9] 徐灵龙, 王知非, 崔林, 等. 乳酸杆菌对大肠埃希菌拮抗作用的研究[J]. 电子显微学报, 2005, 24(4): 401.
- [10] 韩春艳, 侯雨文, 刘志伟, 等. 不同日龄添加乳酸杆菌对早期断奶仔猪生长性能的影响[J]. 畜禽业, 2004, 171: 12-13.
- [11] 乔宏宇, 郎仲武, 董克苏, 等. 接产产酸型活菌制剂对仔猪生产性能的影响及机理初探[J]. 吉林农业大学学报, 1994, 16(2): 74-80.
- [12] Kahraman R, Ozpinar H, Abas I, et al. Effects of probiotic and antibiotic on performance of broilers[J]. Archiv fur Geflugelkunde, 2000, 64(2): 70-74.
- [13] Collington T K. The influence of inclusion of either an antibiotic or probiotic in the diet on the development of digestive enzyme activity in the pig[J]. Brit J Nutr, 1990, 64: 59-70.
- [14] 马雪云, 王红妹. 乳酸杆菌对鸡肠道免疫功能的影响[J]. 中国家禽, 2006, 28(14): 39.
- [15] Ohashi Y, Nakai S, Tsukamoto T, et al. Habitual intake of lactic acid bacteria and risk reduction of bladder cancer[J]. Uml Int, 2002, 68(4): 273-280.

- [16] Budagov RS, Ulianova LP, Chureeva LN, et al. Efficacy of a preparation based on Lactobacillus acidophilus for protection from myelotoxic effects of ionizing radiation and antinoplastic cytostatics[J]. Eksp Klin RLmk01, 2002, 65(2): 59-63.
- [17] Biffi A, Coradini D, Larsen R, et al. Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line[J]. Nutr Qulcer, 1997, 28(1): 93-99.
- [18] Gabala A, Martin MR, Haza AI, et al. Antiproliferative effect of lactic acid bacteria strains of human origin on the growth of amyeloma cell line[J]. Lett Appli Micmbiol, 2002, 32(4): 287-292.
- [19] Seow S W, Rahmat J N, Mohamed AA, et al. Lactobacillus species isolate cytotoxic to human bladder cancer cell strain Mycobacterium Bovis(bacillus-tte-Guerin)[J]. J Uml, 2002, 168(5): 2236-2239.
- [20] Hamilton Miller J M. The role of probiotics in the treatment and prevention of helicobacter pylori infection[J]. Int J Antimicrob Agents, 2003, 22(4): 360-366.

白文鸟的饲养与繁殖

王 静, 邓秋媚

(广州动物园, 广东 广州 510070)

摘要: 本文分析总结广州动物园多年来在圈养条件下饲养与繁殖白文鸟的经验与措施。笼舍内种植草树, 铺设河沙, 有利于防止白文鸟出现趾关节变形等疾病; 设置水浴池, 科学配制日粮, 可满足白文鸟的习性要求和营养需要; 挂置人工巢箱, 添加巢材, 有利于白文鸟营巢产卵孵化; 尽早进行雌雄鉴别配对, 有利于培养亲鸟感情, 快速进入繁殖期。通过采取上述措施, 白文鸟每年持续稳定繁殖, 种群快速扩大。

关键词: 白文鸟; 饲养; 管理

中图分类号: S839

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0022-03

白文鸟(*padda oryzivora*), 又名爪哇禾雀, 雀形目, 文鸟科。原产于马来半岛、苏门答腊、爪哇等地, 因其羽色素雅, 体形娇小, 性情活泼, 故深受养鸟爱好者的青睐。广州动物园饲养白文鸟已有30多年的历史, 1998年前群体保持在15~23只水平, 一直未见扩群以网状笼舍饲养, 1998年后, 通过改建笼舍、设置人工暗巢、增加水浴池、及时进行雌雄鉴定与配对等措施改善饲养管理环境, 白文鸟的繁殖情况有了明显的改善。1998-1999年每年繁殖成功10多只, 随后几年每年稳定增长20只以上, 现种群已增至160多只。本文总结在广州地区笼养状态下, 白文鸟的一些饲养管理措施, 为白文鸟规模化养殖提供参考依据。

1 饲养环境

1.1 笼舍结构 饲养白文鸟的笼舍由运动场和内室两部分组成。运动场用于鸟群飞翔以及游客对鸟群的观赏, 高度2 m左右, 总容积大约60 m³, 外围铁网; 内室供鸟群休息与繁殖, 大约10 m², 室内高度也为2 m左右。运动场与内室地面均为硬地, 铺有厚沙, 运动场内设有浴池。1998年改建为生态笼舍后, 运动场地面改为草地, 并栽种树木, 内舍地面铺以干燥的河沙或木屑。内室与运动场之间的墙壁外侧修建数个仿树洞样的人工巢穴, 供鸟群休息、产蛋或孵化用, 绿树、草地、假石增加了运动场的层次感, 减少了因为铁丝网带来的压抑感。内室由红砖砌成, 室顶铺以石棉瓦, 仅有两

道门供鸟群或饲养人员进出。室内地面设置食槽与水槽, 供鸟群采食饮水, 墙壁上(离地面约1.6 m)悬挂木质繁殖箱数只。

1.2 环境温度控制 白文鸟原产地为热带东南亚地区, 不耐寒。因此我们在夏天将白文鸟笼舍的温度控制在25~30℃, 气温超过30℃时, 我们采取雾化降温装置降温。白文鸟有水浴的习性, 广州地区夏季高温炎热, 仅靠雾化的水汽不能提供足够的水量供其淋浴, 因此我们专门设置水槽供其沐浴, 水槽的水每天更换一次。此外, 笼舍加强通风换气, 保持空气新鲜, 降低舍内氨味。冬季内室温度控制在15℃以上, 此时白文鸟的水浴次数减少, 水浴池隔日换水, 水温控制在20℃左右, 文鸟浴后即将浴池撤走。定期检查内室是否有缝隙, 防止出现贼风。

2 饲养管理

2.1 日粮组成及投喂量 野外的白文鸟食物主要是禾谷科及其他草类种子, 偶食植物果实和少量昆虫。我们模拟白文鸟的野外生态习性, 同时考虑采购的方便性, 配制饲料以红粟为主, 适当添加稻谷、稗子, 配合市售的种鸡颗粒饲料饲喂, 同时按需要不定期添加青草或青菜、蛋黄, 以及少量贝壳、细砂、墨鱼粉、果实和昆虫, 以补充文鸟生长或哺育所需的钙质、各种维生素和微量元素。每年夏末秋初是白文鸟的繁殖高峰。此时我们给亲鸟补充鸡蛋炒米或直接在饲料中添加蛋黄, 以促进发情。

投喂的饲料供白文鸟自由采食, 平均每只的投喂量为 30 g/天左右。白文鸟采食量应因季节不同和生长时期而变化, 每日投喂量做到稍有剩余即可。

2.2 日常管理 饲养员每天早上 8 点进入笼舍, 观察动物的精神状况, 表现不正常的个体取出及时处理, 随后进行笼舍清扫, 更换饲料及饮用水。下午 4 点再投喂一次, 每日撰写饲养日志。

白文鸟繁殖期结束后应将繁殖箱取下, 清洗干净, 用消毒水喷洒消毒, 晾干后在阳光下曝晒, 备用。繁殖期来临前取出挂在墙壁上, 并提供干净的铺垫材料。

2.3 繁殖期管理

2.3.1 备巢 白文鸟在广州地区每年 8 月换羽, 9 月开始发情、营巢、产卵。繁殖期为当年 9 月至翌年 4 月, 所以应在 8 月备巢。繁殖笼的大小一般为 (60×40×50) cm, 笼内安放用木板制成的人工鸟巢, 其尺寸为 (22×15×13) cm, 中间设一块 4 cm 高的隔板, 将巢室分成内外两小间。巢的右下方挖一直径 5 cm 的圆形进巢孔, 左边设一通气孔。巢箱的上盖、侧板可制成活动式的, 以利观察孵化情况和照蛋等。巢箱宜深且暗, 以利于亲鸟安静地在巢中产卵和孵化。若白文鸟不习惯巢箱而显得烦躁不安时, 可将巢箱的巢口朝向侧壁以避免饲养人员或其他白文鸟干扰其产卵和孵化。如果用纸板等物品将巢箱前边遮挡, 则效果更佳。铺垫巢箱的材料可选择细草根、棕榈纤维、碎干草、羽毛、碎软纸等, 在白文鸟产卵时放置于内室, 同时在笼底垫一张报纸, 文鸟营巢时会用嘴将纸撕碎, 与其他材料一起衔入巢中铺垫。

2.3.2 配对 繁殖的亲鸟宜选用 1~2 周岁的青年鸟。在繁殖季节前, 就应留意鸟群中成鸟的日常行为, 细心观察彼此之间的亲密程度, 发现彼此亲近关系密切者, 仔细鉴定其性别并进行配对, 成对饲养于繁殖笼中, 作为亲鸟。繁殖期, 在提供筑巢材料的同时, 要适当给亲鸟增喂一些易促进发情的饲料。

2.3.3 孵化 亲鸟交配后, 雌鸟不时进出鸟巢, 这表明亲鸟即将产卵, 应停喂促进发情的饲料。雌鸟一般 1 天产 1 枚卵。如果发现雌鸟趴着而精神萎缩, 可能是难产, 应及时进行处理。白文鸟每年

可繁殖 3~6 窝, 每窝产 3~7 枚卵, 卵白色有光泽。母鸟产第 2 枚卵后, 开始孵化, 由雄雌亲鸟轮流抱窝。卵孵化 7~8 天后就可以取出照蛋, 以确定其是否为受精卵。照蛋时先将手洗净擦干或戴上胶皮手套, 将蛋取出在太阳光或日光灯下照看, 若发现蛋中带中有纹状细丝则为受精蛋, 蛋中颜色变黑则为“臭蛋”, 蛋中颜色毫无变化则为“白蛋”(未受精蛋), 后两种蛋从窝中取出淘汰。白文鸟卵孵化期一般为 16~17 天。在孵化过程中, 除了照蛋外, 应尽量少惊扰鸟, 应保持笼中安静, 不能随意窥视亲鸟活动, 更不能移动鸟笼。

2.3.4 育雏 白文鸟为晚成鸟, 雏鸟出壳后即可采食。雏鸟食料以鸡蛋炒米为主, 适当添加墨鱼骨粉和青菜。约 1 个月后, 雏鸟羽毛长齐, 可以离巢活动, 但需再过 7~10 天, 雏鸟才能完全离开亲鸟独立生活。如果出现亲鸟抛弃雏鸟时, 可将雏鸟进行人工喂养。即用煮熟的鸡蛋黄 1 个, 与 2% 的葡萄糖水搅拌成糊状, 用牙签挑起来饲喂。每天喂食次数视雏鸟大小而定, 1-7 日龄每天喂 6~8 次, 8-14 日龄每天喂 5~6 次, 15 日龄以后, 每天减至 3~4 次。另外, 寄养也是一种不错的途径, 我们以其他亲鸟作为代母, 多次尝试均取得良好效果。据观察, 即使是体型为雏鸟两倍的外来幼鸟也不会遭到亲鸟的拒绝, 说明白文鸟的母性是很强的。

3 小结与讨论

3.1 白文鸟的性别鉴定与配对是繁殖管理的重要环节。雌雄白文鸟从雏鸟到幼鸟期, 在外观上非常相似, 需要从喙部和目光来仔细辨认加以区别: 雄鸟喙部的色泽呈鲜红色, 上喙部稍微往上突起, 而雌鸟喙部的色泽较雄鸟为淡, 且喙部细长, 不突起。雄鸟的目光较锐利, 表情也较严峻, 然而雌鸟的目光却亲切而温和。另一种较好的鉴别方法是辨认它们的叫声。雄鸟音调较高, 鸣叫时会发出“啾-啾”且较为拉长的声音。而雌鸟的声音则较短促且较细。

3.2 亲鸟在繁殖期营养要充足, 但需要控制饲料的量, 不能让亲鸟过度长膘以影响繁殖。繁殖期亲鸟有时会出现啄蛋行为, 这可能与钙的补充量不足有关。可在亲鸟饲料中加喂蛋壳块(将鸡蛋壳烘干、压碎, 使其成为小块)或骨粉(将猪骨、牛骨或羊骨烘干、压碎, 使其成粉状)。加喂蛋壳或骨粉后

3~7天,亲鸟会逐渐减少啄蛋直至停止。

3.3 趾关节变形脱落是白文鸟较常见的一种疾病。据了解,该病除病原感染因素之外,还与白文鸟的活动场地过硬、缺乏栖架等导致趾关节发育异常有关。我们在白文鸟的笼舍运动场地面种草,内室地面铺上细砂都是为了降低地面硬度,同时适当增加栖架供其攀爬,保证趾关节的正常发育。此外,笼舍内广种草树,有利于减少鸟粪直接污染白文鸟的脚趾。笼舍生态化改造后,白文鸟趾关节变形脱落的现象很少出现。

3.4 水浴可清除鸟体污垢,对白文鸟而言也是一种运动和享受,对文鸟的健康很有帮助,因此应设置水浴池满足它们的本能需求。夏天气温较高时,水浴池应每天换水一次以保证浴池清洁。冬天浴池水温应维持20℃左右,待白文鸟浴后迅速将浴

池撤走或将水放干,以免白文鸟再浴受寒。但从孵化到抱窝前这段时间母鸟不能水浴。因为母鸟湿漉漉的羽毛碰到雏鸟,对雏鸟的健康不利。此时饮水器皿应设置海绵或换个小型的器皿,防止母鸟水浴。

3.5 长期笼养的白文鸟缺乏从自然界获取巢材的条件,人工巢对于笼养白文鸟的繁殖就显得尤为重要。野外白文鸟的巢穴为暗巢,因此人工设计的巢穴应尽量遮光,位置固定,以满足白文鸟产卵和孵化的需要。白文鸟对巢的大小与形状要求不高,我们根据它的这一习性,同时考虑管理的方便,在挂置巢箱的同时,在巢箱附近配置棕榈根等巢材,供亲鸟衔采对巢穴进一步改造,这样不但增强亲鸟的母性,而且巢穴宽敞,避免亲鸟因雏鸟过多而出现驱雏的现象。

山东出台政策规定畜禽养殖禁止占用基本农田

山东出台政策规范畜禽养殖用地管理,畜禽养殖用地将纳入土地利用总体规划,畜禽养殖禁止占用基本农田。

畜禽养殖用地将纳入土地利用总体规划。县级畜牧主管部门在编制畜牧业发展规划时,应当结合畜禽规模养殖发展需要和土地供给的实际情况,提出用地规模、规划布局。县级国土资源管理部门要根据畜牧业发展规划的用地要求,将规模化畜禽养殖用地纳入新一轮土地利用总体规划,乡镇也要按照总体规划的要求,结合实际情况,把畜禽养殖用地纳入土地利用总体规划之中。畜禽养殖要尽量利用废弃地和荒山荒坡等未利用土地,不占或少占耕地,禁止占用基本农田。在新一轮土地利用总体规划修编前,对规模化畜禽养殖用地实行一事一议,提供用地保障。

规模化畜禽养殖用地可享受优惠政策。村集体经济组织、农民和畜牧业合作经济组织(兴办规模化畜禽养殖的单位、个人)兴办规模化畜禽养殖所需用地,视作农业内部生产结构调整用地,按农用地进行管理,不需办理农用地转用和土地征收、征用审批手续,在兴办规模化畜禽养殖场时应按照要求,办理规模化畜禽养殖用地备案手续,并按照农村土地承包经营管理的有关规定,与被用地的农村集体经济组织或土地承包经营权人签订农村土地出租、转包合同。

国土资源部门将加强对规模化畜禽养殖用地的监督管理。除村集体经济组织、农民和畜牧业合作经济组织以外的其他企业和个人,兴办或与村集体经济组织、农民和畜牧业合作经济组织联合兴办规模化畜禽养殖项目的,畜禽舍等生产设施及绿地隔离带等用地,按照农用地进行管理,不需办理农用地转用审批手续。管理和生活用房、饲料储藏用房等设施用地,比照农村集体建设用地管理并办理农用地转用审批手续。规模化畜禽养殖用地确定后,不得擅自改变用途进行非农业建设。未经批准擅自改变畜禽养殖用地为非农业建设用地的,应严格依法进行处理;养殖单位和个人要认真履行耕地复垦义务。养殖用地停止使用后,要及时恢复原有土地等级标准和耕作条件,用于农业耕种。(信息来源:<http://www.china-ah.com/>)

用外源生殖激素提高初产母猪产仔数的研究

徐大光¹, 吕建辉²

(1. 深圳市宝安区光明新区动植物防疫检疫站, 广东 深圳 518107; 2. 广州市动物防疫监督所, 广东 广州 510405)

摘要: 对配种前青年母猪, 分别用 LRH-A3、HCG 和催产素进行肌肉注射, 观察它们对窝产仔数、窝产活仔数的影响。结果表明: 与自然发情配种的青年母猪相比, 首次配种前肌肉注射 LRH-A3 (25 μg)、HCG (100IU) 和催产素 (20 单位), 其窝产仔数分别提高 1.2 头 ($P < 0.05$)、1.0 头 ($P < 0.05$) 和 0.3 头 ($p > 0.05$); 其窝产活仔数分别提高 0.9 头 ($P < 0.05$)、0.7 头 ($P < 0.05$) 和 0.1 头 ($p > 0.05$)。

关键词: 青年母猪; 生殖激素; 产仔数

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0025-01

母猪的繁殖性能是提高猪群数量和质量的的前提条件, 产仔数的多少, 标志着猪场繁殖水平的高低。随着我国工厂化养猪业的迅速发展, 外血缘良种猪的大量引种和杂交利用, 性成熟延迟和母猪乏情率日趋增高, 给养猪生产带来很多困难, 瘦肉型良种场更为突出。养猪生产中, 初产母猪在商品场和种猪场都占有相当大的比例 (20%~30%), 其繁殖力的高低对全群影响很大^[1]。初产母猪普遍存在排卵数少, 产仔数少, 存活率低, 死胎多等问题。为此, 我们对后备青年母猪进行了配种前注射外源生殖激素, 提高初产母猪产仔数的研究。

1 材料与方 法

1.1 激素制剂 促排卵素 3 号 (LRH-A3): 宁波激素制品有限公司生产, 200 μg/支; 人绒毛膜促性腺激素 (HCG): 上海第一生化药业公司生产, 500 IU/支; 催产素: 泰州立昌生物制药厂生产, 100 单位/支。

1.2 试验动物及分组处理 广东省某大型猪场即将配种的健康长大二元杂后备青年母猪 83 头, 随机分成 4 组, 各组处理见表 1。采用人工授精进行配种, 两次输精间隔 8~12 h。妊娠母猪采用相同的饲养管理技术, 日喂 2 次, 保证母猪营养需要, 保持母猪中上等膘情, 并适当运动, 防流产保胎。

表 1 试验分组及处理

试验分组	供试母猪数	处理方法
对照组	23	不作处理, 发情时配种
试验 I 组	20	首次配种前 30 min 肌注 LRH-A3 25 μg
试验 II 组	20	首次配种前 30 min 肌注 HCG 100IU
试验 III 组	20	首次配种前 5 min 肌注催产素 20 单位

1.3 数据处理 记录母猪接受交配日期、情期受胎率, 分娩日期、产仔数、活仔数情况。对各组的配种分娩率、窝均总产仔数与窝均产活仔数进行显著性 t 检验。

2 结果与分析

2.1 配种分娩率 四组的配种分娩率差异不显著 ($p > 0.05$)。

2.2 窝产仔数 与对照组相比, 试验 I 组、II 组和 III 组的窝产仔数, 分别提高 1.2 头 ($P < 0.05$)、1.0 头 ($P < 0.05$) 和 0.3 头 ($p > 0.05$)。表明首次配种前 30 min 肌注 LRH-A3 和 HCG 可明显提高产仔数, 而用催产素处理虽可提高产仔数, 但未达到显著水平。

2.3 窝产活仔数 与对照组相比, 试验 I 组、II 组和 III 组窝产活仔数, 分别提高 0.9 头 ($P < 0.05$)、0.7 头 ($P < 0.05$) 和 0.1 头 ($p > 0.05$)。表明肌注 LRH-A3 和 HCG 可明显提高产活仔数, 而用催产素处理虽可提高产活仔数, 但未达到显著水平。见表 2。

表 2 试验母猪的受胎与产仔情况

组别	母猪数 (头)	配种分娩率 (%)	窝产仔数 (头)	窝产活仔数 (头)
对照组	23	91.30 ^{ad}	8.2±1.2 ^a	7.8±1.3 ^a
试验 I 组	20	95.00 ^a	9.4±2.1 ^b	8.7±1.9 ^b
试验 II 组	20	95.00 ^a	9.2±2.2 ^b	8.5±1.7 ^b
试验 III 组	20	90.00 ^a	8.5±1.6 ^a	7.9±1.8 ^a

1): 同一行中肩标字母相同差异不显著 ($p > 0.05$), 字母不同差异显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

GnRH 是下丘脑释放的促性腺素释放激素, 刺激垂体前叶 LH 和 FSH 的分泌, 经血液循环作用于

(下转第 30 页)

口蹄疫 O 型、Asia I 型免疫抗体的检测

王玉红¹, 黄炯^{1,2}, 薛英², 朱刚¹, 赵海源¹, 马文戈², 郭惠玲¹, 徐亚萍¹, 吕春华³, 田野³
(1. 新疆天康畜牧生物技术股份有限公司, 新疆 乌鲁木齐 830032; 2 新疆畜牧科学院兽医研究所乌鲁木齐, 新疆 乌鲁木齐 830000; 3. 新疆阿勒泰地区动物防疫监督站, 新疆 阿勒泰 836500)

摘要: 用口蹄疫 O 型和 Asia I 型双价疫苗对牛、羊进行免疫, 于免疫后一个月和五个月, 分别用口蹄疫 O 型和 Asia I 液相阻断 ELISA 型试剂盒进行抗体监测。结果牛在免疫后一个月, O 型抗体水平 $\geq 1:128$ 的占 91.96%, 免疫后五个月 O 型和 Asia I 型的抗体仍维持较好水平, $\geq 1:128$ 的比率接近 50%, 说明免疫效果较理想。同时对免疫后一个月血清的液相阻断 ELISA 法和正向间接血凝法 (IHA) 测定结果进行了比较, 经统计学分析, 其相关系数为 $r = 0.8854$, 说明两种方法检测结果较相近, 两者间有较好的相关性, 且液相阻断 ELISA 法比 IHA 所测定的滴度普遍偏高。

关键词: 口蹄疫; O 型; Asia I 型; 免疫抗体; 液相阻断 ELISA 法; 正向间接血凝法

中图分类号: S851.34

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0026-02

口蹄疫 (FMD) 是偶蹄动物的一种急性、热性、高度接触性传染病, 该病传播途径多、传染性强、为多种动物共患, 严重危害家畜的生产力和畜产品质量, 给畜牧业生产造成了较大损失, 并直接威胁着国际贸易、国家声誉和人类食品卫生安全, 因而受到人们的普遍关注^[1]。目前最有效的防治措施就是对猪、牛、羊等易感动物进行强制免疫, 而免疫效果主要依靠免疫动物产生的抗体水平来评价。目前口蹄疫抗体检测方法主要有: 中和试验、正向间接红细胞凝集试验 (间接血凝试验)、微量补体结合试验、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等^[2]。本试验使用新疆天康畜牧生物技术股份有限公司生产的口蹄疫 O 型、Asia I 型二价灭活疫苗 (批号 2006002) 于 2006 年 10 月 5-15 日对新疆阿勒泰地区的牛、羊进行免疫, 于免疫后一个月和五个月, 对免疫动物随机抽样采血制备血清, 用液相阻断 ELISA 和正向间接血凝试验对其抗体水平进行了检测和评价。

1 材料与方 法

1.1 材料 血清: 牛、羊免疫血清共计 91 份, 其中 2006 年 11 月 12-20 日采集的免疫一个月后的血清 51 份, 2007 年 3 月 17 日采集的免疫五个月后的血清 40 份。

液相阻断 ELISA 试剂盒和正向间接血凝试剂, 均购于中国农业科学院兰州兽医研究所。其中, 液相阻断 ELISA Asia I 型试剂盒批号: 2007011501;

液相阻断 ELISA O 型试剂盒批号: 2007011502; 正向间接血凝试剂批号: 阳性血清: 060720; 阴性血清: 060721; 稀释液: 060717; 抗原: 061027。

1.2 方法 按液相阻断 ELISA (口蹄疫 O 型和 Asia I 型) 试剂盒说明书进行。O 型: ELISA 抗体效价 $\geq 1:128$, 保护率 99% 以上; 抗体效价在 1:22~1:90, 保护率 50%; 抗体效价 $\leq 1:16$, 不保护。Asia I 型与 O 型相同。

正向间接血凝也按照试剂盒说明书进行, 效价 $\geq 1:256$ 为免疫有效; 效价 $\geq 1:64$ 为免疫合格。

2 结果

2.1 口蹄疫 O 型抗体液相阻断 ELISA 法与正向间接血凝法对免疫后一个月血清样品测定结果 免疫后一个月的 51 份牛血清中, O 型液相阻断 ELISA 抗体效价 $\geq 1:128$ 的占 91.96% (46/51, 即具有 99% 以上保护率); 抗体效价在 1:22~1:90 的占 7.84% (4/51, 即具有 50% 保护率); 抗体效价 ≤ 16 的占 1.96% (1/51, 即不保护)。正向间接血凝效价 $\geq 1:256$, 有效免疫的占 27.45% (14/51); 效价 $\geq 1:64$ 免疫合格的占 82.35% (42/51)。见表 1。

以液相阻断 ELISA 法检测的每个数据与正向间接血凝 (IHA) 法检测的每个数据进行统计学分析, 其相关系数为 $r = 0.8854$ 。

2.2 用液相阻断 ELISA 法检测免疫动物 5 个月后亚洲 I 型和 O 型抗体的水平 免疫牛、羊 5 个

表 1 口蹄疫 O 型抗体液相阻断 ELISA 法
与正向间接血凝法测定结果的比较

序号	牛号	液相阻断 ELISA 测定结果	正向间接血凝试验结果	序号	牛号	液相阻断 ELISA 测定结果	正向间接血凝试验结果
1 ^D	1	>1:128	1:256	27	20	1:181	1:256
2	2	>1:128	1:128	28	40	1:181	1:32
3	3	>1:128	1:256	29	42	1:362	1:64
4	4	>1:128	1:128	30	44	1:724	1:64
5	5	>1:128	1:256	31	45	1:362	1:256
6	6	>1:128	1:128	32	120	<1:16	1:4
7	7	>1:128	1:16	33	121	1:181	1:32
8	8	>1:128	1:128	34	123	1:45	1:8
9	9	>1:128	1:256	35	124	1:45	1:128
10	74	>1:128	1:256	36	125	1:181	1:64
11	77	>1:128	1:256	37	126	1:362	1:128
12	46	1:1448	1:128	38	128	1:362	1:32
13	47	1:1448	1:64	39	129	1:362	1:64
14	48	>1:2048	1:128	40	131	1:724	1:128
15	49	>1:2048	1:128	41	139	1:181	1:128
16	50	>1:2048	1:64	42	132	1:362	1:64
17	52	1:90	1:32	43	133	1:362	1:64
18	72	>1:2048	1:64	44	135	1:181	1:64
19	75	1:362	1:128	45	138	1:45	1:64
20	76	1:181	1:128	46	141	1:181	1:16
21	78	1:362	1:256	47	145	1:724	1:64
22	11	1:1448	1:16	48	147	1:181	1:128
23	13	1:181	1:64	49	149	1:724	1:256
24	17	1:724	1:256	50	151	1:181	1:256
25	18	1:724	1:128	51	152	1:362	1:256
26	19	1:724	1:256				

1):1-33 号样品来源于阿勒泰市萨尔胡松乡,34-51 号样品来源于红石头牧场。

月后,液相阻断 ELISA 法检测 Asia I 型抗体,抗体效价 $\geq 1:128$ 占 50% (20/40); 抗体效价在 1:22~1:90 占 37.5% (15/40); 抗体效价 ≤ 16 占 12.5% (5/40); 液相阻断 ELISA 法检测 O 型抗体,结果抗体效价 $\geq 1:128$ 占 42.5% (17/40); 抗体效价在 1:22~1:90 占 52.5% (21/40); 抗体效价 ≤ 16 占 5% (2/40)。结果见表 2。

3 讨论

3.1 通过免疫接种提高畜群整体抗体水平是预防口蹄疫的重要手段,抗体水平检测是对免疫效果的一种直观评估。通过本试验口蹄疫 O 型抗体液相阻断 ELISA 法与正向间接血凝法测定结果比较,以液相阻断 ELISA 检测的每个数据与正向间接血凝 (IHA) 数据进行统计学分析,其相关系数为 $r=0.8854$,说明:两种方法检测结果基本一致,两者间有较好的相关性,且液相阻断 ELISA 法比 IHA 所测定的滴度普遍偏高,约高出 3~30 倍。这说明液相阻断 ELISA 法具有更高的灵敏性和特异性。凝集试验通常是一个定性的检测方法,即根据

表 2 用液相阻断 ELISA 法检测 O 型、亚洲 I 型二价
灭活疫苗免疫动物 5 个月后的抗体水平结果

序号	畜号	Asia I 型抗体滴度	O 型抗体滴度	序号	畜号	Asia I 型抗体滴度	O 型抗体滴度
1	牛 1	1:45	>1:128	21	牛 21	>1:128	>1:128
2	牛 2	>1:128	1:90	22	牛 22	>1:128	>1:128
3	牛 3	1:45	1:90	23	牛 23	>1:128	>1:128
4	牛 4	>1:128	>1:128	24	牛 24	>1:128	>1:128
5	牛 5	>1:128	>1:128	25	牛 25	>1:128	>1:128
6	牛 6	>1:128	>1:128	26	牛 26	<1:16	1:32
7	牛 7	>1:128	>1:128	27	牛 27	1:90	>1:128
8	牛 8	>1:128	>1:128	28	牛 28	>1:128	>1:128
9	牛 9	1:90	1:23	29	牛 29	1:64	1:64
10	牛 10	>1:128	1:90	30	牛 30	1:128	1:90
11	牛 11	1:23	<1:16	31	羊 1	<1:16	1:64
12	牛 12	1:90	1:64	32	羊 2	1:23	1:90
13	牛 13	>1:128	>1:128	33	羊 3	>1:128	1:90
14	牛 14	1:23	1:23	34	羊 4	1:90	1:23
15	牛 15	1:45	1:23	35	羊 5	1:90	1:90
16	牛 16	1:45	1:45	36	羊 6	<1:16	1:64
17	牛 17	<1:16	<1:16	37	羊 7	1:128	1:45
18	牛 18	1:32	1:45	38	羊 8	1:128	>1:128
19	牛 19	1:16	1:23	39	羊 9	1:90	>1:128
20	牛 20	>1:128	>1:128	40	羊 10	>1:128	1:45

凝集现象的出现与否判定结果阳性或阴性;也可以进行半定量检测,即将标本作一系列倍比稀释后进行反应,以出现阳性反应的最高稀释度作为滴度^[3]。由于凝集反应方法简便,敏感度较高,无需特殊设备,因而在野外检验中被广泛应用。经对比试验证明,在口蹄疫免疫抗体 (O 型) 的检测中,液相阻断 ELISA 法与 IHA 法两者相关性较好。

3.2 通过液相阻断 ELISA 法检测免疫后 5 个月抗体水平可以看出,该口蹄疫 O 型、Asia I 型二价灭活疫苗免疫牛羊后产生的抗体水平较高,且维持时间较长。免疫 5 个月后,Asia I 型抗体免疫合格率仍然在 85% 左右,O 型抗体免疫合格率仍达 95%,达到了较好的免疫效果。通过 10 只羊的抗体水平检测结果可见,其抗体水平相对于牛而言较低,仍有 20% 的羊 Asia I 型抗体水平处于可保护程度之下。

参考文献:

- [1] Wong HT, Cheng SCS, Sin FWY, et al. A DNA vaccine against foot-and-mouth disease elicits an immune response in swine which is enhanced by co-administration with interleukin-2[J]. Vaccine, 2002, (20):2641-2647.
- [2] Wu QH, Moraes MP, Grubman MJ. Recombinant adenovirus co-expressing capsid protein of two serotypes of foot-and-mouth disease virus (FMDV): in vitro characterization and induction of neutralizing antibodies against FMDV in swine[J]. Virus Research, 2003, 92 (2):141-149.
- [3] 农业部畜牧兽医司. 家畜口蹄疫及其防治[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994. 1-3.

芦荟干粉对鸭肝炎病毒人工感染雏鸭肝损伤的保护试验

古飞霞, 苏明辉, 冯元璋, 刘容珍

(仲恺农业工程学院生命科学学院, 广东 广州 510225)

摘要: 用含 0.5%、1%、1.5% 芦荟干粉的饲料, 饲喂雏麻鸭 1w, 于 8 天龄时通过人工肌注途径感染鸭病毒性肝炎病毒, 观察 1w, 比较与不服用芦荟干粉的对照麻鸭的增重、谷丙转氨酶水平、肝组织病理变化等指标的差异。结果表明芦荟干粉增重效果比对照组提高 14.3%~36.2%, 并可显著降低谷丙转氨酶水平, 减轻肝细胞变性坏死及胆小管增生等肝组织的损伤程度。

关键词: 芦荟干粉; 转氨酶; 鸭病毒性肝炎; 增重

中图分类号: S858.32

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0028-03

随着抗病毒药物禁止用于饲养动物, 探讨天然植物或中草药作为饲料添加剂, 防治鸭病毒性肝病是安全养鸭的重要内容之一。芦荟中的有效成分芦荟素(Aloetin), 有解毒护肝、增强肝脏功能的作用; 芦荟中的芦荟多糖, 能极好地帮助肝脏分解对人体细胞有害的化学物质, 灭活各种病毒与有害菌, 促进肝脏的血液循环, 有效地修复受损肝细胞, 恢复肝功能。但这些作用仅在鸡、小白鼠等动物试验中得到证实^[1-4]。为进一步验证芦荟护肝促生长及治疗鸭病毒性肝炎的效果, 特进行本试验。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验鸭 出壳蛋麻鸭苗, 购自花都赤坭孵化场, 分组笼上饲养, 灯光保暖, 自由饮水, 每天 3 次喂给广州白云饲料厂生产的小鸭碎粒料。

1.1.2 鸭肝炎病毒 由本教研室分离保存, 经雏鸭 1 代、鸭胚 2 代培养、纯化, 对 1w 麻鸭的 LD₅₀ 为 10^{-2.8}/0.1 mL, 分装多瓶保存于 -28℃ 备用。

1.1.3 芦荟干粉 即库拉索芦荟(Aloe barbadensis Miller, 又称 Aloe Vera) 全叶烘干粉。它是用种植三年的库拉索芦荟鲜叶, 在 70℃ 以下且有抗氧化条件保护下进行干燥、灭菌制造而成, 最大限度地保存了芦荟鲜品的各种有效活性成分。购自深圳玛拉芦荟产业有限公司。

1.1.4 谷丙转氨酶试剂盒 购自中生北控生物科技股份有限公司(批号:080811.200801)。

1.2 方法

1.2.1 芦荟干粉对雏麻鸭增重的影响测定 240

只初生雏麻鸭随机分为四组, 其中 A1、A2、A3 组, 以拌成半湿料方式, 分别喂含芦荟干粉 0.5%、1% 和 1.5%, C 组为不加芦荟干粉组。第 1、3、5、6、7 d 龄整组称重, 计算平均体重, 并比较组之间差异。

1.2.2 雏麻鸭人工感染鸭病毒性肝炎 在 A1、A2、A3 组麻鸭中再各自分为 3 组, 分别肌肉注射稀释为 10⁻³、10⁻⁴ 和 10⁻⁵ 的鸭肝炎病毒液, 每只 0.1 mL。即 A1 组鸭分为 3a1、4a1、5a1 组; A2 组分为 3a2、4a2、5a2; A3 组分为 3a3、4a3、5a3; C 组也分 3C、4C、5C 组; 空白对照组 NC 注射灭菌水替代病毒液。攻毒后, 记录鸭的发病、死亡情况, 同时剖检, 观察和记录病变。

1.2.3 谷丙转氨酶指标的测定 人工感染后 12h、24h、36h、48h、60h、72h、96h、120h、144h 和 7d, 各组分别抽血检测血清中谷丙转氨酶水平, 血清样品经全自动生化分析仪(意大利 ECHO 公司产品)检测谷丙转氨酶, 所得数据经 Excel 处理, 采用 F 检验和多重比较进行组间差异性分析。

1.2.4 肝脏病理组织学检查 在 1.2.3 采血同时, 各组剖杀 2 只鸭, 取肝脏用 10% 福尔马林固定, 进行病理组织切片, 观察肝损伤程度。将肝损伤程度定级为: -: 正常肝组织(NC 组鸭); "+": 肝细胞变性或点状坏死; "++": 肝细胞变性或局灶性坏死; "+++": 肝小叶不到 1/3 肝细胞坏死; "++++": 肝小叶坏死超过 1/3。

2 结果与分析

2.1 芦荟干粉影响雏麻鸭增重的结果 对照组 C 的体重增长速度较慢, 喂芦荟干粉的 3 组的体重增长速度与饲料中芦荟干粉含量成正比, 各组组间的体重增长结果差异极显著(p<0.01)。与

C组相比较, 体重增长的幅度为:A3组 36.2%、A2组 24.1%、A1组 14.3%。见图1。结果表明芦荟干粉有促进雏鸭早期生长增重的作用。添加0.5~1.5%的芦荟干粉对鸭子增重可起到很好的促进作用, 而且有芦荟添加量越大, 增重越快的趋势。

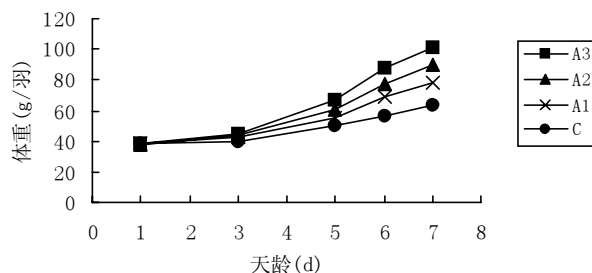


图1 各组雏鸭体重增长情况

2.2 人工感染鸭病毒性肝炎的症状与剖检病变 人工肌肉注射感染鸭肝炎病毒后, 在36h, 3C组个别鸭出现精神沉郁、行动迟缓。在48h、72h和84h分别死亡1只。死亡雏鸭角弓反张, 剖检均见肝肿大, 呈淡红色, 质脆, 因表面多个出血点和出血斑, 而显斑驳状; 胆囊肿胀, 内充满胆汁, 胆汁呈褐色; 脾脏肿大、充血, 呈斑驳状; 肾肿胀, 有出血斑, 并有尿酸盐沉积, 呈现花状斑; 心包积液, 心肌色淡、变软; 肠黏膜呈卡他性炎症。3C组症状和病变与临床鸭肝炎的表现一致。其他各组雏鸭均未见死亡。NC对照组雏鸭未见异常。

2.3 肝脏病理组织学检查结果 C组肝组织呈现鸭肝炎特征性肝损伤变化: 感染24h后已见肝细胞变性坏死, 细胞间隙血细胞增加, 肝小叶局部肝细胞坏死至广泛性肝细胞坏死, 胆小管增生明显。喂服芦荟干粉的试验组也出现肝细胞坏死、炎性细胞渗出和胆管增生等现象, 但较C组的病变的程度轻。各组肝细胞变性坏死, 胆小管增生等肝损伤程度降低1~2个“+”, 而且病变的程度与芦荟干粉的用量成反比。同时感染病毒量的多少也直接影响到病变的程度, 10^{-3} 感染量各组的病变较明显, 10^{-5} 感染量各组的病变较轻。见表1。

2.4 对血清谷丙转氨酶的影响 三个不同病毒感染量的各组对谷丙转氨酶的影响结果如图2、图3和图4。感染病毒各组即 10^{-3} 感染组 (3a1、3a2、3a3、3C) 和 10^{-4} 感染组 (4a1、4a2、4a3、4C) 与NC组之间的差异极显著 ($p < 0.01$), 而 10^{-5} 感染组 (5a1、5a2、5a3、5C) 与NC组之间的差异不显著 ($p > 0.05$)。3C和4C的谷丙转氨酶水平明显高于

同一感染量的其他组。从谷丙转氨酶降幅比较: 10^{-3} 感染组较对照组降低了6.9%~36.0%, 10^{-4} 感染组低4.8%~27.3%, 10^{-5} 感染组低1.5%~5.7%。

结果表明: 感染量为 $10^{-5}/0.1\text{mL}$ 时, 因病毒量太少而未能引起肝细胞急性坏死, 血清中的谷丙转氨酶接近正常组水平。感染量为 10^{-3} 、 10^{-4} 时, 能引发急性肝炎, 造成雏鸭部分死亡, 转氨酶大幅上升。饲喂芦荟能降低转氨酶升幅。1.5%芦荟干粉组 (3a3组) 的转氨酶升幅不大, 感染后窄幅上升, 但4~5d后很快回落并接近正常 (NC组) 水平。

表1 人工感染鸭病毒性肝炎的肝组织损伤程度

组别	24h	48h	72h	96h	120h	144h	7d
3a1	+++	++++	++++	++++	+++	+++	+++
3a2	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++
3a3	++	++	++	++	++	++	+
3C	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
4a1	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
4a2	+++	+++	+++	+++	++	++	++
4a3	+	+	+	+	+	+	+
4C	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++
5a1	++	++	++	+	+	+	+
5a2	++	++	++	+	+	+	+
5a3	+	+	+	-	-	-	-
5C	++	++	++	+	+	+	+

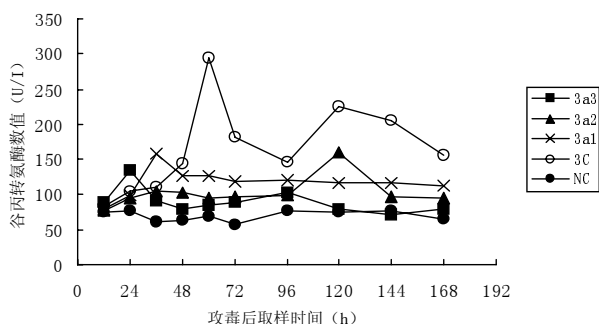


图2 $10^{-3}/0.1\text{mL}$ 感染组与空白对照组NC谷丙转氨酶数值变化比较

3 小结与讨论

3.1 本试验结果表明: 芦荟干粉对雏鸭特别是周龄内雏鸭有促进增重和提高抗病毒能力的作用。因此, 在耗料量少的雏鸭期, 饲料中添加芦荟干粉, 对于减少雏鸭应激反应, 提高成活率, 提高增重, 增强免疫接种应答等方面将有显著成效。

3.2 试验条件下, 8天龄雏鸭能够抵抗肌肉注射 $0.1\text{mL} 10^{-3}$ 稀释 ($\text{LD}_{50}=10^{-2.8}/0.1\text{mL}$) 的鸭肝炎强毒攻击, 表明芦荟干粉对鸭肝炎病毒感染有一定的防治效果。虽然大剂量长时间使用含芦荟饲料对鸭的健康有负面影响^[5], 但本试验雏鸭喂含1.5%芦荟干粉饲料15d, 未发现鸭有任何不良

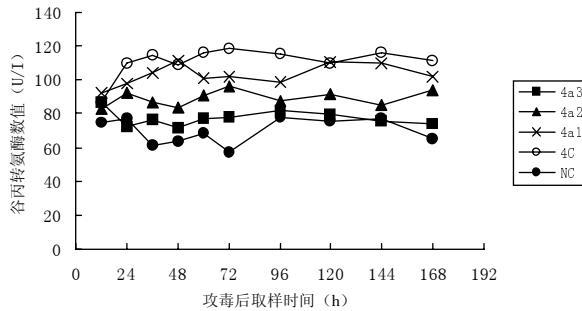


图3 10⁻⁴/0.1mL 感染组与空白对照组 NC 谷丙转氨酶数值变化比较

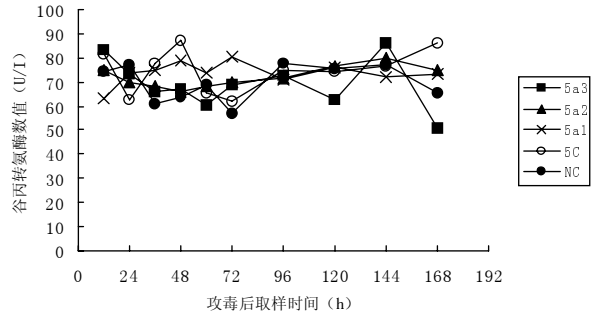


图4 10⁻⁵/0.1mL 感染组与空白对照组 NC 谷丙转氨酶数值变化比较

反应。建议在生产实际中可在雏鸭饲料中添加 1%~1.5%芦荟干粉,防治鸭病毒性肝炎。

参考文献:

[1] 崔旻, 姜建石. 芦荟的药理研究概况[J]. 中国药业, 2007, 16(16): 17-19.
 [2] 蒋林, 冯元璋, 王琴, 等. 芦荟乙酰化甘露聚糖对肉仔 cAMP

cGMP 与免疫功能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2005(41): 7-10.
 [3] 罗霄山. 芦荟大黄素对 CC14 损伤原代培养大鼠肝细胞的保护作用[J]. 中医学刊, 2003, 21(7): 1101-1102.
 [4] 田兵, 华跃进, 马小琼. 芦荟抗菌作用与蒽醌化合物的关系[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(11): 1034-1037.
 [5] 周宇红, 冯永全, 杨华. 芦荟全叶粉 90 天亚慢性毒性研究[J]. 卫生研究, 2003, 32(6): 590-593.

(上接第 25 页)

卵巢,从而促进母猪卵泡的发育、成熟和排卵;还可起到促使母猪成熟卵泡集中排出的效应^[2]。配种后激素水平充足有利于妊娠建立和胚胎存活,其中最重要的是孕酮(P₄)水平,配种后黄体期 P₄ 分泌不足常导致胚胎死亡^[3]。P₄ 减少是导致胚胎附植前后死亡的因素之一。对妊娠第 3 周母猪黄体 P₄ 含量测定结果表明,约有 20%的胚胎死亡与 P₄ 缺乏有关,妊娠 2 周内胚胎死亡率与尿中 P₄ 代谢产物水平呈正相关。因此,适量的适当激素处理可提高母猪胚胎存活率。在配种后使用 P₄ 以降低猪胚胎死亡的措施已证实有效^[3]。

本研究中,首次配种前注射外源生殖激素 LRH-A3 和 HCG,明显提高青年母猪的产仔数,这同国内相关报道结果基本一致^[4,5]。注射 GnRH 或其类似物,对怀孕早期 P₄ 含量有明显影响,注射 GnRH 或其类似物的母猪在妊娠第 15 d 其 P₄ 含量显著提高(17.24 ng/mL vs 9.5 ng/mL)^[5]。因此,GnRH 和 HCG 是通过促进母猪排卵和促进 P₄ 分泌两方面来提高母猪的产仔数及存活率。实践中可用 GnRH 类似物来提高母猪窝产仔数。

催产素是促进子宫收缩的重要激素,自然交配刺激可使母猪分泌催产素。在输精时添加外源的催产素,可加速子宫收缩,提高精液吸纳的进

程。自然交配后母猪血浆中的催产素达 40 pmol/L,而使用生理盐水注入子宫后的催产素浓度仅为 3 pmol/L 左右。催产素有促进精子输送的作用,在输精前注射催产素可改善人工授精的成绩^[6]。本研究中,首次配种前注射催产素,虽提高青年母猪的产仔数,但效果不明显,这与罗旭芳等报道的结果基本一致^[7]。看来,改善精子的运行速度不是提高受胎率和产仔数的关键,而提高配种后体内 P₄ 水平,降低猪胚胎死亡率,提高母猪胚胎存活率,才是提高产仔数的关键所在。

参考文献:

[1] 田允波, 郭金彪. 提高初产母猪繁殖力的技术措施[J]. 养猪, 2004, (1): 8-12.
 [2] 周虚, 张嘉保, 田允波. 动物繁殖学[M]. 长春: 吉林人民出版社. 2003.
 [3] 崔恒宓. 母猪胚胎死亡原因[J]. 国外畜牧科技, 1990, 17(2): 18-20.
 [4] 田允波. 应用外源激素提高母猪繁殖率[J]. 黑龙江动物繁殖, 1996, (3): 37-39.
 [5] 姜德相, 赵彦兵, 董桂红, 等. GnRH 对提高母猪受胎率和产仔存活数作用的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1998, (9): 6-7.
 [6] 郭有海, 蒋荣章, 李清丰, 等. 公猪精液中添加内泌素或授精前注射催产素对母猪繁殖性能的影响[M]. 猪只人工授精技术. 台湾养猪科学研究所, 1996, 82-91.
 [7] 罗旭芳, 张守全, 蔡巨广, 等. 催产素在输精时不同处理方法对母猪繁殖性能的影响[J]. 黑龙江动物繁殖, 2001, 9(3): 1-2.

使用畜禽疫苗应注意的问题

陈华守, 杨朝周, 谢乐新, 张煜坤, 陈景娣
(广东省动物疫苗供应站, 广东 广州 510520)

中图分类号: S851.33

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0031-02

“预防为主,防重于治”的原则向来为畜禽养殖场所重视,然而在实际工作中,人们往往因为对免疫理论和技术缺乏了解,从而影响了免疫的效果,造成不应有的经济损失。笔者根据几年来的实践经验,总结了一些关于使用畜禽疫苗时应注意问题,以供参考。

1 做好使用前的准备工作

1.1 制定合理的免疫程序 根据畜(禽)群的实际抗体效价,结合本场流行病的特点,制定合理的免疫程序。最好能根据抗体检测结果,适时地进行调整。免疫程序一经确定,就要严格执行。当其他养殖场发生疾病时,千万不要立即进行紧急预防,否则会打乱正常的免疫程序,更易造成传染病的发生。

1.2 疫苗的选择 应根据免疫程序,确定要使用疫苗的品种和数量。要从当地动物疫病预防控制中心或有兽用生物制品经营许可证的经营单位购买疫苗,不要到那些没有常规疫苗保存设施的单位购买疫苗(包括经常停电的地方)。所购买的疫苗需有农业部批准生产文号或进口批准文号。冻干苗应不失真空、粉体没有裂纹(失效苗有裂纹),油乳剂灭活苗没有破乳分层现象。过期或即将过期的疫苗严禁使用。疫苗选择要科学,慎用中试疫苗和自家苗。

1.3 疫苗的保存和运输 冻干苗常在 -15°C 以下环境中冷冻保存,切忌反复冻融;灭活疫苗在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 环境中冷藏保存较好,严防冻结。有的疫苗的保存条件比较特殊,如马立克氏病细胞结合疫苗必须在液氮中保存。疫苗的运输要严格实行冷链运输,一般应保持在 8°C 以下。建议大批量畜禽疫苗运输最好使用带有冷藏设备的车辆;疫苗储藏运输量较小时,可以用泡沫塑料箱,并放入冰块或冰袋。

1.4 接种前的注意事项 接种之前,应准备好充足的人员、免疫器械、用具等,详细了解被注射动物的品种及健康状态,凡病、弱、孕畜暂时均不宜

免疫注射,已证明进行紧急预防接种有效的疫苗,如新城疫疫苗、猪瘟疫苗等除外。为降低接种疫苗时畜禽的应激反应,在大群注射疫苗时,有必要将大群分隔成小栏,以减少畜(禽)群应激时相互践踏。可在接种前一天以及以后几天时间里用维生素C、电解多维拌料或饮水,以缓解畜(禽)群应激,提高免疫效果。接种活疫苗前后各7天,应停止使用对疫苗敏感的抗病毒、抗菌类药物,同时应避免用消毒剂饮水。

2 疫苗的免疫接种

2.1 免疫剂量 一般情况下按照疫苗说明书的剂量即可,或者遵照当地兽医的指导。种畜(禽)可适量加大剂量;采用饮水免疫时剂量加倍,饮水量还要根据季节、气温等因素有所变化;紧急接种时剂量可加倍;同时应注意同类疫苗的普通型、浓缩型和吸收等情况,选择适宜的注射剂量。但在实际工作中,发现许多养殖者有超剂量应用疫苗的现象,这不仅不能使畜禽产生相应的免疫能力,反而还会造成一定的经济损失。

2.2 疫苗的稀释 一定要按照疫苗使用说明书的要求使用稀释液。有些疫苗的稀释要专用的稀释液,如猪的乙脑疫苗和伪狂犬病疫苗,鸡的马立克氏病疫苗等。一般来说,若无特别规定,病毒性活疫苗的稀释用生理盐水,细菌性活疫苗用20%铝胶生理盐水来稀释。饮水免疫,可用蒸馏水、纯净冷水或深井水,不能用含有消毒药物(如漂白粉)的水或温热水,忌用金属容器,最好在饮水中按0.1%浓度加脱脂奶粉来保护疫苗。

2.3 注射部位选择 根据疫苗说明书上的用法或遵照当地兽医的指导,应选择能使机体产生抗体最快、最佳的部位进行接种。如猪肌肉注射时,应选择肌肉丰满而又远离大血管和神经的部位,如颈侧、臀部等;鸡颈部皮下注射为好,其次是胸

部肌肉注射, 一般不要采用腿部肌肉注射, 否则会影响鸡的正常活动。

2.4 选择合适的免疫接种方法 常用的方法有肌肉注射、皮下注射、皮肤刺种、口服、点眼、滴鼻、饮水、刷肛、喷雾等。原则上按照疫苗说明书的用法或者遵照当地兽医的指导。但有些疫苗要严格按照说明书使用, 如鸡痘疫苗以翅膜刺种为好, 羊痘弱毒苗要皮内注射, 猪的腹泻疫苗多采用后海穴注射, 猪的喘气病活疫苗采用胸腔注射。

2.5 疫苗临用前应升至常温 冻干苗使用时要检查真空度。在用注射器稀释疫苗时, 将注射器针头插入疫苗或菌苗瓶塞内, 注射器中的液体会自动滴入疫苗瓶中, 毋需用手推注, 否则疫苗即失去真空, 应弃用。稀释后充分摇匀。灭活苗在使用前必须充分摇匀后使用, 尤其对放置一段时间后的油乳剂灭活苗和水苗。灭活苗一般在开封后 8 ~ 12 h 内用完, 最长不超过 24 h。活苗稀释后应放在冷暗处, 宜 2 h 内用完, 最好不超过 4 h。使用疫苗最好在早晨或傍晚。

2.6 注意疫苗间的干扰作用 在实际操作中, 两次疫苗接种间隔时间不可过短, 一般应在一周以上, 更不能随意将几种同毒力和种类的疫苗同时接种, 以防止产生干扰现象。如同时接种鸡痘和新城疫疫苗, 两者会产生干扰, 影响免疫应答, 导致免疫失败。

2.7 做好安全试验 弱毒活疫苗一般具有残余毒力, 能引起一定的免疫反应, 对敏感动物和处于潜伏期的畜禽可能激发病情, 甚至引起死亡。因此, 在全面开始防疫之前, 应对每批疫苗做 20~30 头份的安全试验, 确认安全后方可全面开展防疫注射。

2.8 紧急免疫接种顺序 当一个地区面临疫病

流行时, 可实行紧急免疫接种, 其接种顺序应先从安全区再到受威胁区, 最后到疫区。疫区应先从假定健康畜禽到可疑感染畜禽。

2.9 其它 接种疫苗必须由受过专业培训的兽医技术人员负责操作, 同时做好保定工作, 严格执行消毒及无菌操作。为防止交叉感染, 注射时要做到一畜一针, 禽类可在注射 30 只左右换一次针头。瓶塞上要固定一个针头专供吸取药液。同时, 做到注射部位准确、到位, 严禁打飞针。点眼、滴鼻免疫时, 要保证疫苗进入鸡的眼睛、鼻腔里。饮水免疫时鸡只要先停水 3 h, 饮水时间应在 1 h 左右, 以保证每只鸡都能喝到足够数量的疫苗。喷雾免疫要均匀, 雾滴大小、喷雾高度和速度要适当。

3 免疫接种后的处理工作

3.1 免疫接种后所使用的器械, 要严格消毒, 疫苗瓶应放于火中焚烧, 预防弱毒疫苗遇到适宜的环境会返强而变成污染源, 给全场带来危害。

3.2 免疫接种后, 特别是在 1 h 之内, 要有专人认真检查畜禽中是否有过敏或严重应激反应的, 同时准备好肾上腺素、地塞米松等抗过敏药品, 便于及时抢救。有的疫苗接种后继发引起呼吸道症状, 应及时进行对症治疗。

3.3 畜禽接种疫苗后一般要经过 7~21 天才能产生免疫力, 在此期间若出现剧烈的应激反应将会直接影响畜禽免疫力的产生。因此, 接种疫苗后要切实加强饲养管理, 减少应激反应对畜禽的影响。

3.4 注意做好免疫记录, 以备出现问题时便于及时查明原因, 采取相应的对策。

3.5 在条件允许的情况, 免疫接种 14~21 天后, 进行免疫效果的监测, 根据畜禽免疫抗体水平的高低, 从而决定是否需要补免。

上海浦东生猪养殖场精准化管理初见成效

对生猪养殖场实行精准化管理是通过加强和规范生猪养殖档案记录, 全面掌握养殖动态变化的一种管理模式。从 2008 年 1 月起, 浦东新区动物卫生监督所通过免费发放各类档案记录、举办档案记录培训班、深入养殖场进行现场指导、与各养殖场签订承诺书和加强日常监督检查等各种举措, 对全区范围内的生猪规模场推行精准化管理。

在今年 4 月区监督所对全区规模生猪养殖场开展的生猪存栏清点工作中, 新区规模养殖场的当天存栏记录数与监督所的现场清点数基本相符, 各猪场的公猪、母猪存栏数与现场清点数为零误差, 各类生猪的转栏记录也日趋准确。针对部分猪场在养殖档案记录和内部管理中存在一些问题, 区所执法人员进行了认真分析, 并提出了切实可行的指导性建议。

目前推行精准化管理的养殖场的养殖档案记录日趋及时、真实和精准, 同时各养殖场病死生猪的无害化焚烧处理率和生猪出栏报检率都达到 100%。(信息来源: <http://www.china-ah.com/>)

雷州黄牛促卵泡素受体基因 (FSHR) 的多态性分析

魏伍川, 黄 斌

(湛江师范学院生物科学与技术系, 广东 湛江 524048)

摘要: 利用 PCR-RFLP 技术分析了雷州黄牛 FSHR 基因的多态性, 检测到 2 种基因型和 2 个等位基因, 基因 A 的频率为 0.99, 基因 B 的频率为 0.01。比较分析发现, 不同牛种基因频率的差异可能与牛种的血统起源相关。

关键词: 雷州黄牛; PCR-RFLP; FSHR 基因多态性

中图分类号: S859.799.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0033-02

促卵泡素 (FSH) 是调控动物繁殖活动的重要垂体激素之一, 它必须通过作用于靶细胞膜上的促卵泡素受体 (FSHR) 的介导、放大, 才能起调控动物的繁殖功用。因此, 从 1990 年克隆和测定出大鼠的 FSHR 基因 cDNA 全序列之后, 不同动物, 尤其是家养畜禽的 FSHR 基因受到广泛关注和研究, 不仅测定完成了羊 (Yarney 等, 1993)、猴 (Gromoll 等, 1993)、牛 (Alain Hould 等, 1994)、鸡 (S. You 等, 1996)、小鼠 (M. Tena-Sempere 等, 1999) 和人的 FSHR cDNA 全序列, 而且对该基因表达和基因多态的分析也日益广泛。

雷州黄牛是广东省的重要牛种, 也是湛江地区农民养殖和致富的当家家养动物。因此分析和研究雷州黄牛的 FSHR 基因多态性, 对于研究提高雷州黄牛的繁殖效率具有积极意义。

1 材料与方法

1.1 材料 雷州黄牛 50 头, 采集血样, 用苯酚氯仿抽提法提取基因组 DNA。实验用 DNA 聚合酶、限制性内切酶、RNA 酶、蛋白酶 K 及苯酚、氯仿、琼脂糖、dNTPs 等药品、试剂, 均购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

1.2 实验方法 选择扩增和分析雷州黄牛的 FSHR 基因第一外显子和 5' 端上游序列, 扩增目的 DNA 片段的引物引自魏伍川等的文献^[1], 引物序列为: 上游引物: 5' -AATTC ATTG TGCCA GCATCC-3', 下游引物: 5' -AGTTC GACCG CATCC CTG-3'。引物由北京鼎国生物技术有限公司合成。根据与 Genbank 中的序列比照, 该引物扩增 DNA 片段长度约 970 bp。

PCR 反应按 25 μ L 体系。反应液组成为: 含 20 mmol/L $MgCl_2$ 的 10 \times PCR buffer 2.5 μ L,

10 mmol/L dNTPs 0.5 μ L, 20 pmol/L 的上下游引物各 2.5 μ L, 基因组 DNA 250 ng, TaqDNA 聚合酶 2 U, 加灭菌双蒸水至 25 μ L。

PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}C$ 变性 5 min 后, 按 94 $^{\circ}C$ 1 min 变性, 65 $^{\circ}C$ 1min 退火, 72 $^{\circ}C$ 1min 延伸, 循环 30 次, 最后在 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min, 降温至 4 $^{\circ}C$ 保存。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳, 紫外分析仪检测结果。

对扩增的 FSHR 基因产物用 PCR-RFLP 方法进行多态性分析, 限制性内切酶 Taq I 进行酶切, 酶切反应体系 20 μ L。其中 PCR 产物 10 μ L, 10 \times 内切酶缓冲液 2.0 μ L, BSA 2.0 μ L, 内切酶 0.5 μ L, 用无菌去离子水补足 20 μ L。在 65 $^{\circ}C$ 水浴中酶切 3.5~4 h, 结果用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 实验结果 图 1 为提取的基因组 DNA 电泳检测结果。PCR 扩增结果见图 2。扩增产物长度符合预期大小, 说明扩增结果正确, 扩增出了预期的 FSHR 基因片段。

用限制性内切酶 Taq I 对扩增产物进行酶切, 结果见图 3。50 头个体中仅 1 头牛的酶切基因型与其它个体不同, 参照文献 1 判定为 AB 基因型 (图 3 中的 5 号, 电泳图上具有 586 bp、446 bp 和 292 bp 三条可见带), 其余均为 AA 基因型 (具有 446 bp 和 292 bp 两条可见带), 未检测到 BB 基因型个体。

2.2 基因型频率和基因频率统计 对扩增的雷州黄牛 FSHR 基因片段, 用内切酶 Taq I 酶切出现的 2 种基因型和 2 个等位基因的频率统计结果, AA 基因型频率 0.98, AB 基因型频率 0.01。A 等位基因频率 0.99, B 等位基因频率 0.01。经 χ^2 检验, 雷州黄牛的基因频率和基因型频率符合

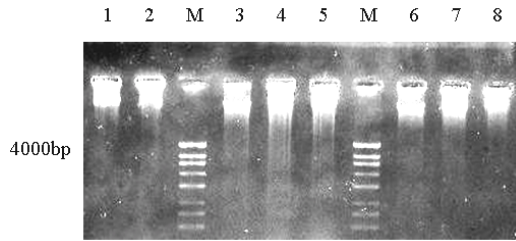


图 1 DNA 样品琼脂凝胶电泳图谱

M:4000bp DNA ladder, 1-8:不同牛个体的 DNA

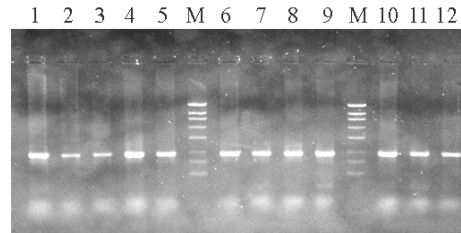


图 2 PCR 扩增产物琼脂凝胶电泳图谱

M:4000bp DNA ladder, 1-12:不同牛个体的 PCR 扩增产物

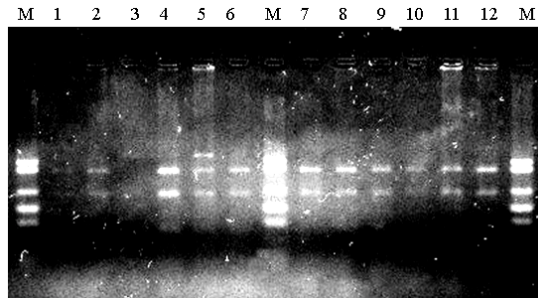


图 3 PCR 产物 Taq I 酶切的电泳图谱 1

M:ladder; 1-12: TaqI 酶切结果

Hardy-Weinberg平衡状态。

将雷州黄牛的 FSHR 基因频率和基因型频率与我国的其它黄牛品种的基因频率和基因型频率^[2,3]相比较(表 1)发现,雷州黄牛和河南南阳黄牛的 A 等位基因频率占绝对优势,而居于中原地带的秦川牛和晋南牛以及居于东北的延边牛 A、B 等位基因的频率趋于中数。据吴伟等研究^[4],南阳黄牛属瘤牛血统,而延边牛属普通牛血统。张志清等分析认为^[5],南阳牛的瘤牛血统占 72.7%,而秦川牛的普通牛血统占 74.2%、晋南牛占 76.7%。说明该基因的不同等位型在不同牛种中的频率差异与牛种的血统相关。

3 讨论与小结

通过对雷州黄牛的 FSHR 基因片段的扩增和应用限制性内切酶 Taq I 酶切,检测到雷州黄牛的 FSHR 基因存在 AA 和 AB 两种基因型,其中 AA 基因型个体占 98%,AB 基因型个体 2%,未检测到

BB 基因型个体。统计结果,A 等位基因频率 0.99, B 等位基因频率 0.01。说明 B 等位基因在雷州黄牛群中属于稀有基因。

比较分析发现,雷州黄牛的等位基因频率分布态势与南阳牛相近,而与秦川牛、晋南牛和延边牛差异较大。由于雷州黄牛和南阳牛均属于瘤牛血统起源,而秦川牛、晋南牛和延边牛属于普通牛血统起源,这说明这一基因的不同等位型频率分布与牛种的血统起源相关。

FSHR 是作用于动物繁殖活动的中介受体蛋白,不同等位基因型可能影响牛的繁殖活动和效率^[1,2],因此,在雷州黄牛 FSHR 基因位点检测出的多态性,可作为以后研究雷州黄牛繁殖性状的遗传标记,有利于对雷州黄牛生产性状和分子遗传学基础的进一步研究。

参考文献:

- [1] 魏伍川,许尚忠.牛促卵泡素受体基因 5' 端转录启动调控区的序列分析与多态性研究[J].畜牧兽医学报,2002,33(5):417-423.
- [2] 雷雪芹,魏伍川,陈宏,等.6个牛品种在 FSHR 基因位点的遗传关系及其多态对双胎性状的标记[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2004,32(7):1-6.
- [3] 雷雪芹,陈宏,袁志发,等.牛 FSHR 基因第 10 外显子单核苷酸多态性及其与双胎性状的关系[J].中国生物化学与分子生物学报,2004,20(1):34-37.
- [4] 吴伟,王栋,曹红鹤.微卫星 DNA 标记对 5 个中外黄牛品种/群体遗传结构的研究[J].吉林农业大学学报,2000,22(4):5-10.
- [5] 张志清.中国四个黄牛品种的父亲系和母系起源研究[D].西北农林科技大学.2005.

表 1 6 个黄牛品种的基因型频率和基因频率比较

种群	基因型频率			基因频率	
	AA	AB	BB	A	B
雷州黄牛	0.9800	0.0200	0.0000	0.9900	0.0100
南阳黄牛	0.9063	0.0937	0.0000	0.9531	0.0469
秦川黄牛	0.3000	0.6000	0.1000	0.3500	0.6500
晋南黄牛	0.2134	0.4286	0.3517	0.4286	0.5714
延边黄牛	0.2857	0.4857	0.2286	0.5286	0.4714

影响核移植后小鼠重构胚存活因素的研究

彭礼繁¹, Tatiana Sviridova-Chailakhyan², 罗光彬¹

(1. 沈阳农业大学动物胚胎工程实验室, 沈阳 辽宁 110161; 2. 俄罗斯科学院理论与试验生物物理学研究所, 莫斯科 俄罗斯)

摘要: 将不同类型的供体细胞(卵丘细胞、心肌细胞和上皮细胞)的遗传物质注射到去核的MII卵母细胞中, 获得各种重构胚胎, 以分析对小鼠卵母细胞进行核移植操作获得重构胚过程中的各种影响因素。结果表明, 用Giemsa染料将挤出的卵母细胞质染色证实, 可以完整地去除MII卵母细胞核。对370个MII卵母细胞进行去核, 去核成功率为92.4%, 注核成功率为82.1%; 给予90 v/mm, 80 μsec, 1次电脉冲刺激, 融合率为72.1%; 将融合激活后的重组胚转入KSOM培养基中, 平均囊胚率达到35.8%。在胚胎重构过程中, 出现了核仁显著变大, 出现不同数量核仁的现象。通过比较各种重构胚胎体外后续发育, 结果卵丘细胞重构胚胎的体外发育率最好。

关键词: 小鼠; 核移植; 重构胚

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0035-04

哺乳动物囊胚内细胞团中的胚胎干细胞(ESC)分离技术^[7,12,15,19], 直接促进了与病人有相同基因组的干细胞替代性治疗的发展^[5,8,9,11,18]。目前, 在不同物种的重构胚胎体外后续发育上积累了许多研究资料^[1,14,16,17,20]。在研究中遇到的共同问题是重构胚胎在不同发育阶段的死亡率均较高。其原因有: 一是核移植对细胞造成外来伤害, 引起重构过程中的死亡; 二是重构胚胎的外来基因组在重编程过程中凋亡, 造成畸形发育而导致重构胚死亡。植入的供体核和它们的遗传物质在去核卵母细胞中的重编程是影响重构胚后续发育的主要因素^[6,8,13,14]。本试验将含有遗传物质的不同供体细胞(卵丘细胞、心肌细胞和上皮细胞)注入到去核MII卵母细胞, 分析这些重构胚的体外后续发育能力。目的在于采用最佳的试验方法和体外培养基来提高小鼠重构胚胎的体外后续发育能力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~8周龄的昆明系小鼠, 雌性, 体重约20~25 g, 购自大连医科大学实验动物中心, 合格证号: SCXK(辽)2004-0017。

1.1.2 主要仪器设备 拉针仪(PN-30)、锻针仪(MF-900)、磨针仪(EG-400)、电融合仪(BTX-830), 均为日本Narishige公司生产; 荧光显微镜

(VANOX-1000X)、生物显微镜附显相系统(JVC KY-1900E)、实体生物显微镜(M37610-26), 均为日本OLYMPUS公司生产; CO₂培养箱(BB5060UV), 香港产; 倒置显微镜及显微操作系统(DMIRB), 德国Leica公司生产; 电子天平(BS210S), 德国赛多利斯公司生产; 生物超净工作台(BCM-1000, 江苏苏净集团安泰公司生产。

1.1.3 药品与试剂 高糖DMEM、胰酶、胎牛血清(FCS)、透明质酸酶、PVP(聚乙烯吡咯烷酮)等均购于Sigma公司。孕马血清促性腺激素(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(hCG), 购于宁波第二激素厂。

1.2 方法

1.2.1 MII期卵母细胞的收集 于小鼠腹腔注射5 IU PMSG, 48 h后再腹腔注射5 IU hCG, 13~15 h后颈椎脱臼法处死。从输卵管壶腹部获得卵丘-卵母细胞复合体(COCs), 置于含有0.1%透明质酸酶的M2培养基中。待卵母细胞周边的卵丘细胞全部分散为单个细胞时, 停止消化。将卵母细胞转移到M16培养基中, 37℃、5%CO₂培养箱培养至去核前。

1.2.2 供体细胞的准备 卵丘细胞的准备: 按1.2.1方法超排处理小鼠, 分离COCs后, 置于含0.1%透明质酸酶的M2培养基中, 待卵母细胞周边的卵丘细胞全部分散为单个细胞时, 停止消化。将卵丘细胞转移到含有10%PVP的M2培养基中,

37℃、5%CO₂ 培养箱中培养至去核前。心肌细胞和上皮细胞的准备: 上皮细胞和心肌细胞是通过经胰酶消化的新生昆明胎鼠的组织而获得。方法: 将 1-3 日龄的胎鼠断头, 将腹膜打开, 无菌分离肾脏和心脏后, 在 DMEM 培养基中冲洗。用手术剪将分离的组织剪成碎块 (0.5×0.5)mm, 然后在 37℃ 下用 0.25% 胰酶处理 15~20 min。再以 1 500 rpm 离心 2 min, 最后培养在含 10% FCS 的 DMEM 培养基中。在无血清的培养基中培养 1~10 d 使之同步化到 G₀ 细胞期。在含 5%FCS 的培养基中对细胞密度在 10⁵ 个/cm² 的贴壁细胞进行传代, 获得同步化到 G₁ 期的细胞。但本试验中也检测到在培养基中分离培养 1~10 d 后的非同步化心肌细胞。因此, 我们认为心肌细胞培养的最佳时间是 9 d。根据培养皿表面细胞的固定时间来确定原代培养基的换液时间。

1.2.3 核移植 MII 卵母细胞去核: 选择细胞饱满、透明带界面清晰、无分裂碎片和第一极体明显可见的卵母细胞。将待去核的卵母细胞放入不含细胞松弛素 B (CB) 的 M2 操作液滴中 (渗透压约 140 mL/L) 培养 10 min。用持卵针固定卵母细胞, 将第一极体置于时钟 3 点的位置。在第一极体下方, 用去核针轻轻刺入透明带达卵周隙, 经第一极体基部, 到达第一极体上方的透明带, 将透明带切开一个约 25 μm 小口。首先将第一极体挑出, 再用去核针轻轻挤压卵母细胞, 并联合持卵针对卵母细胞行适当的负压吸引, 去除极体下方包含 MII 期染色体-纺锤体复合体的最少量细胞质 (约 1/4 细胞质)。

去核效果的鉴定: 把挤出细胞质用甲醇: 冰醋酸 (3:1) 固定液固定 1 h, 再用 0.5% Giemas 染色 1~2 min, 将细胞质置于载玻片上。在载玻片上相当于盖玻片四个角的位置上涂上凡士林, 然后用盖玻片将细胞质轻轻压扁。荧光显微镜下观察去核效果。经过染色后含有 MII 期染色体-纺锤体复合体的细胞质中的遗传物质呈淡蓝色, 说明该 MII 卵母细胞的去核完全。

供体核细胞的注射: 将去核的卵母细胞转移到含有 CB 的 M2 培养基 (渗透压约 140 mL/L) 中, 于 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 1 h。挑选直径 8 μm 左右的供体细胞作为核移植供体, 用内径为 10 μm 的尖口注射针将细胞吸进和退出, 反复几次, 将供体细胞膜软化。沿透明带上原来的去核针口,

将供体细胞直接注射到卵周隙透明带下。再用注射针轻压卵母细胞膜, 使供体细胞和受体细胞质紧密接触, 获得小鼠供体核-卵母细胞复合体。

1.2.4 电融合 用针式细胞电融合仪在电融合液内完成。两个电极之间充满电融合液, 供体核-卵母细胞复合体置于两个针式电极之间, 在电融合液中静止 15 min。使用电脉冲刺激为 90 v/mm, 80 μs, 1 次, 对小鼠供体核-卵母细胞复合体融合, 使之成为一个完整的细胞-重组胚。

1.2.5 电融合后融合情况的观察 将重组胚置 M16 培养基中培养 90 min, 观察重组胚融合情况, 计算融合比率。细胞融合的判定: 供体、受体细胞间的接触面消失, 表明供体核已进入卵母细胞质。

1.2.6 重组胚的激活 将融合后的重组胚转移到无 Ca²⁺ 的 M2 培养基 (含 10 mmol/L Sr²⁺ 和 5 μg/mL CB), 37℃、0.5%CO₂ 培养箱培养 6 h。

1.2.7 重组胚的体外培养和观察 将激活后的重组胚, 放置在 KSOM 培养基中, 37℃、5% CO₂ 培养箱培养, 每隔 24、48、72、96 h 观察体外发育情况。同样条件下培养的正常受精卵作为对照。

1.3 数据处理 采用统计软件包 SPSS 11.0, 实验数据进行 χ² 检验。

2 结果

2.1 MII 卵母细胞的去核和注核 在本实验中, 完成一个 MII 卵母细胞的完整去核, 平均时间为 20 s。用 Giemas 将挤出的卵母细胞质染色后观察, 证实可以完整地去除 MII 卵母细胞的细胞核 (图 13)。共对 370 个 MII 卵母细胞去核, 有 342 个 MII 卵母细胞结构完整, 无细胞质流出, 去核成功率为 92.4%; 随后对 342 个去核卵母细胞进行注核, 注核后有 281 个卵母细胞结构完好, 注核成功率为 82.1%, 其中: 卵丘细胞 (n=75), 上皮细胞 (n=106) 和心肌细胞 (n=100)。

2.2 重组胚的融合和早期发育 给予电脉冲刺激为 90 v/mm, 80 μs, 1 次, 共融合 281 个复合体。在电融合发生后有 251 个细胞完好, 完好率为 89.3%。通常观察到复合体融合时间 90 min, 共有 181 个细胞发生融合, 融合率为 72.1%。将融合激活后的 181 个重组胚转入 KSOM 培养基中, 于 37℃、5%CO₂ 条件下培养。12 h 内有 106 个重组胚原核形成, 原核形成率为 58.6%。36 h 内有 86 个发育到

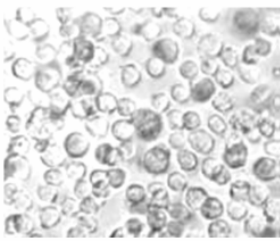


图 1 卵丘细胞

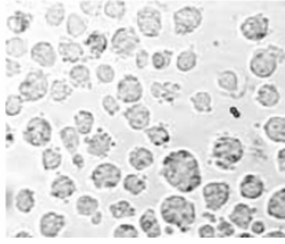


图 2 上皮细胞

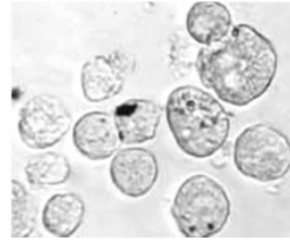


图 3 心肌细胞

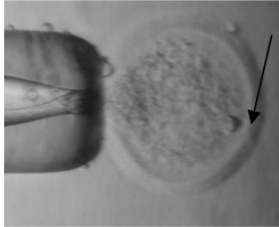


图 4 将卵丘细胞注入去核卵母细胞中

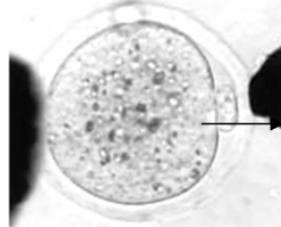


图 5 电融合

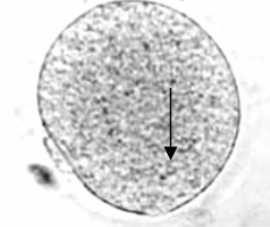


图 6 卵丘细胞与去核卵母细胞的融合

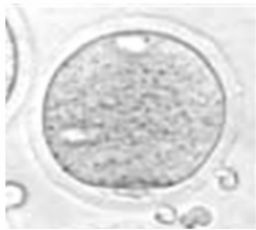


图 7 重构胚胎

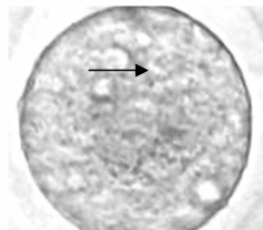


图 8 其他供体细胞核

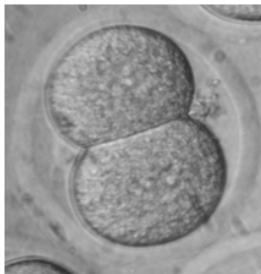
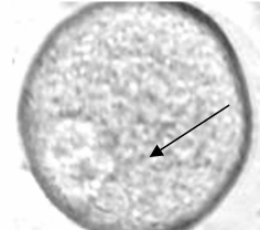


图 9 2-细胞期的胚胎

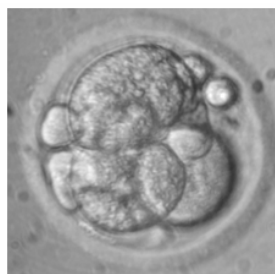


图 10 不正常发育的胚胎

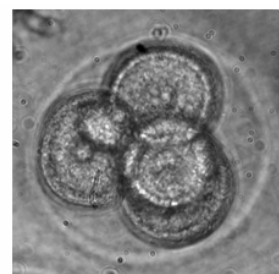


图 11 四细胞期的重构胚

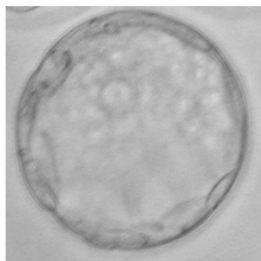


图 12 囊胚阶段的重构胚

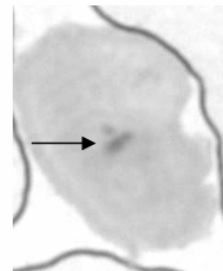


图 13 挤出的含有染色体的细胞质 (箭头所示)

2-细胞期,占 81.1%;51 个发育到 4~8 细胞期,占 48.1%。72 h 内有 38 个发育到囊胚期,占 35.8%。在胚胎重构几个小时后,供体核的结构和功能发生变化:核仁显著变大,出现不同数量的核仁(图 8)。通过比较分析体外培养重构胚胎发育到囊胚阶段的过程,发现卵丘细胞重构的胚胎体外发育率最高,能够发育到桑椹胚和囊胚阶段,而其他供体细胞组成的重构胚在早期阶段就停止了发育。

3 讨论

适宜的体外培养条件能够确保重构胚较高的体外后续发育能力。本试验采用的显微操作培养基,可提高重构胚的体外存活率,其中最关键的是培养基的渗透压。对小鼠卵母细胞进行显微操作的培养液,渗透压通常是 140 mL/L,这比其它动物的(290~320 mL/L)要低 2 倍多。该渗透压的培养基能够有效地避免显微操作过程中细胞的死亡,从而提高重构效率和供核体细胞与去核卵母细胞的电融合效率。

在本试验中,使用了上皮细胞来进行细胞同步化试验。在无血清的培养基中将它们培养了 1~10 d,使这些细胞都同步化到 G₀ 细胞期。实验结果表明:最好的重构结果是从同步化 2~3 d 达到 G₀ 期的上皮细胞中获得的。

在本试验中,我们首先在透明带上切开一个小口,再轻轻地挤压和负压吸引卵母细胞对卵母细胞进行去核,不需要 Piezo 装置。用自制尖锐且尖端封闭的去核针,在卵母细胞透明带上切开一个 20 μm 的线状小口,可最大限度地保持卵母细胞的完整性,避免卵母细胞的过度损伤和胞质流出,能很方便地将第一极体挑出。由于染色体-纺锤体复合体常常紧靠在第一极体的下方,较易借助微去核针轻轻挤压和注核针的负压吸引作用,完整去除细胞核^[21]。该去核方法与其他学者进行小鼠核移植方法比较,在卵母细胞的去核部位和去核的多少是相同的,可以保证完全去核和重组胚的进一步发育。本试验用 0.5% Giemsa 染液对挤出卵母细胞质进行染色,也证实了该去核方法可以完整地去除 MII 卵母细胞的细胞核。获得的重组胚在体外培养下至少能够发育到桑椹胚期,说明获得的重组胚能够完成重新编程,并支持早期胚的发育。

供体核移入受体卵母细胞的部位,主要有卵母

细胞的卵周间隙(即透明带下)和细胞胞质内注射两种。前者需借助电融合等方法使供体核-卵母细胞胞质进行融合,才能启动重新编程的过程。后者简称胞质内直接注射法,只要激活即可。本试验表明:去核后直接将卵丘细胞核注射到小鼠的胞质中,容易使细胞破裂,导致胞质溢出;采用将卵丘细胞注射到透明带下的方法,构建供体核-卵母细胞复合体后,用电融合法诱导复合体融合,并对重组胚激活,结果重组胚成功发育至桑椹胚阶段。

值得注意的是,我们以前认为能够引起细胞核变化的卵母细胞质,对重构过程的影响比较小。但从本试验中供体核的结构变化和重构胚胎后续发育的结果可以看出,重构后的受体细胞质也能够促进不同供体细胞核的重编程。

参考文献:

- [1] Lagutina I S, Galat V V. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. *Ontogenez*, 2001, 32(3):180-195.
- [2] Wakayama S, Kishigami S, Thuan N V, et al. Propagation of an infertile hermaphrodite mouse lacking germ cells, using nuclear transfer and embryonic stem cell technology[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, (102):29-33.
- [3] Chailakhyan L M, Sviridova-Chailakhyan T A. Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes[J]. *Nauka Ross*, 2001, (2):10-15.
- [4] Chailakhyan T A, Vikhlyantseva E F, Chebotareva T N, et al. Gene targeting in embryonic stem cells[J]. *Dokl Ross Akad Nauk*, 2003, 338(4):1-3.
- [5] Colman A, Kind A. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rat embryos[J]. *Trends Biotechnol*, 2000, (8):192-196.
- [6] Dean W, Santos F, Stojkovic M, et al. Effect of donor cell age on the efficiency of nuclear transfer in rabbits *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98(24):13734-13738.
- [7] Gao S, Han Z, Kihara M, et al. Protease inhibitor MG132 in cloning: no end to the nightmare[J]. *Trends in Biotechnology*, 2005, (23):66-68.
- [8] Hochedlinger K, Jaenisch R. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(3):275-286.
- [9] Hwang W S, Ryu Y J, Park J H, et al. Nuclear transplantation of embryonic stem cells in mice *Science*[J]. 2004, 303(5664):1669-1674.

- [10] Jonneau A, Renard J P. Production of cloned mice from embryonic stem cells arrested at metaphase[J]. *Curr Opin Gen Dev*, 2003, 13(5): 486-491.
- [11] Krbling M, Estrov Z. Effect of cell confluence on production of cloned mice using an inbred embryonic stem cell line[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(6): 570-582.
- [12] Zhou Q, Renard J P, Le Friec G, et al. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation [J]. *Science*, 2003, (302): 1179.
- [13] Ogonuki N, Inoue K, Yamamoto Y, et al. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro[J]. *Nat Genet*, 2002, (30): 253-254.
- [14] Rideout W M, Eggan K, Jaenisch R. Production of cloned mice from in vitro systems[J]. *Science*, 2001, 293(5532): 1093-1098.
- [15] Rossant J. Cloning of female mice from adult somatic cells[J]. *Stem Cells*, 2001, 19(6): 477-482.
- [16] Rybouchkin A, Heindryckx B. Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using cumulus cells[J]. *Reproduction*, 2002, (124): 197-207.
- [17] Solter D. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature cells[J]. *Nat Rev Genet*, 2000, (1): 199-207.
- [18] Surani A. Nuclear transfer into zygotes[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2003, 13(5): 445-447.
- [19] Ogura A, Inoue K, Takano K, et al. Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2000, 57: 55-59.
- [20] Wakayama T, Yanagimachi R. Nuclear transfer into mouse zygotes[J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, (58): 376-383.
- [21] 沈新明, 乔贵林, 江培洲, 等. 改进的核移植方法完成小鼠卵丘细胞重组胚的早期发育[J]. *第一军医大学学报*, 2005, 25(6): 613-618.

欢迎订阅

ISSN1005-8567
CN 44-1243/S

《广东畜牧兽医科技》 (双月刊)

(1976年创刊, 大16开本, 正文52页)

主管单位: 广东省农业科学院

主办单位: 广东省畜牧兽医学会、广东省农科院畜牧研究所、广东省农科院兽医研究所

读者对象: 畜牧兽医行政管理人员、科研人员、技术推广人员, 大专院校师生, 种畜禽、兽药和饲料生产厂家技术人员, 基层畜牧兽医工作者和饲养专业户等相关人员。

订 价: 每期定价 5.5 元, 全年 33.00 元(含平寄邮费)。

订阅方式: 本刊实行自办发行。读者可通过邮局直接汇款至本刊编辑部。

注意事项: 汇款时请注明订阅份数、邮政编码、详细收刊地址、单位名称、收件人姓名、电话等相关资料, 以免误投。

地 址: 广州市先烈东路 135 号《广东畜牧兽医科技》编辑部 (邮编: 510500)

电 话: 020-37245052、37288167 E-mail: gdxmsy@163.com

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告

复方中药对热应激肉鸡血液自由基影响的研究

邹洁建¹, 王建荣², 苏力³, 陈武³

(1. 广东省野生动物救护中心, 广东 广州 510520; 2. 广州市野生动植物保护管理办公室, 广东 广州 510030; 3. 广州动物园, 广东 广州 510070)

摘要: 将14日龄肉鸡60羽随机均分为3组: 常温对照组、热应激对照组和试验组, 试验组与热应激对照组饲养条件相同, 试验组饲料中添加1%复方中药。3个组肉鸡定期采血, 测定血清GSH-Px、SOD的活性和MDA的含量。结果表明: 与正常对照组相比, 热应激对照组肉鸡血清GSH-Px、SOD活性下降, MDA含量则上升, 其中血清GSH-Px活性显著降低, MDA的含量显著增加($P < 0.05$)。结果表明, 复方中药能提高正常肉鸡血清GSH-Px、SOD活性, 降低MDA的含量, 对抗热应激所致的肉鸡血清GSH-Px、SOD活性下降和MDA含量升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。提示本复方中药具有较显著抗自由基损伤的作用, 能有效地清除体内过多的自由基。

关键词: 中药; 热应激; 肉鸡; 氧自由基

中图分类号: S853.7

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0040-02

环境温度是肉鸡集约化生产过程中的一个重要影响因素。当环境温度高于27℃时就会引起鸡的应激。热应激不仅造成鸡生长缓慢, 生产性能下降, 还能破坏动物体内正常抗氧化体系平衡, 降低机体抗氧化能力, 导致体内脂质过氧化反应异常, 从而引发一系列的问题^[1,2]。本试验研究复方中药对热应激下肉鸡血清中SOD、GSH-Px活性和MDA含量的影响, 探讨复方中药通过抗自由基产生而提高其抗热应激的作用效果, 为抗热应激中草药的研究和开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 中药制剂的制备 中药材, 购自广东南海中药材公司, 复方制剂由黄芪、党参、白术等中药按一定比例构成, 粉碎成末状备用。

1.2 实验动物与分组处理 选用14日龄健康岭南黄肉鸡60羽, 饲养于单层鸡笼内, 供给全价饲料, 自由饮水和采食。将肉鸡按体重随机分成3组, 每组20羽, 分别设为常温对照组、热应激对照组和试验组。试验组在饲料中添加1%复方中药添加剂, 常温对照组和热应激对照组不添加复方中药添加剂。

1.3 试验模型建立 试验在广州市高温季节(7-8月)进行, 常温对照组饲养于空调房内, 温度控制在 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度50%~70%; 热应激对照组及试验组分别饲养在清洁级动物房内, 日间温度为 $33 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度为65%~95%。

1.4 血样采集 分别于试验开始后的10 d、20 d、30 d、40 d的上午8:00, 每组各取5只鸡, 心脏

采血2 mL分离血清, -20°C 保存待测。

1.5 氧自由基指标的测定 血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)以南京建成生物工程研究所提供的试剂盒检测。所用主要仪器为722型分光光度计。

1.6 数据处理方法 用统计软件SPSS13.0对常温对照组、试验组和热应激对照组之间进行Duncan检验。表中结果为平均数±标准误($\bar{x} \pm SE$), 其中 $P > 0.05$ 表示差异不显著, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 复方中药对血清中SOD活力的影响 复方中药对血清中SOD活力的影响见表1。在整个试验期间, 常温对照组、试验组的SOD活性均高于热应激对照组, 其中在40 d时试验组显著高于热应激对照组($P < 0.05$), 其它各组差异不明显($P > 0.05$)。

2.2 复方中药对血清中MDA含量的影响 复方中药对血清中MDA含量的影响见表2。在整个试验期间, 热应激对照组的MDA含量高于常温对照组和试验组, 10 d时试验组极显著低于热应激对照组($P < 0.01$), 在30 d常温对照组、试验组均显著低于热应激对照组($P < 0.05$), 其余时间各组间有差异但不显著($P > 0.05$)。血清中MDA的含量与血清SOD活力呈负相关。

2.3 复方中药对血清中GSH-Px活力的影响 复方中药对血清中GSH-Px活力的影响见表3。在整个试验期间, 热应激对照组的GSH-Px活力均低

表 1 血清中 SOD 的活力

单位: U/mL

组别	10d	20d	30d	40d
常温对照组	258.7±33.9	225.0±35.5	244.9±38.7	253.0±26.8 ^{ab1)}
试验组	263.4±27.0	250.0±15.7	254.2±23.9	316.6±30.1 ^a
热应激对照组	215.9±24.5	223.3±22.3	195.3±14.6	214.1±28.6 ^b

1): 同列小写字母中无一相同字母者表示差异显著 (P < 0.05), 同列大写字母中无一相同字母者表示差异极显著 (P < 0.01)。下同。

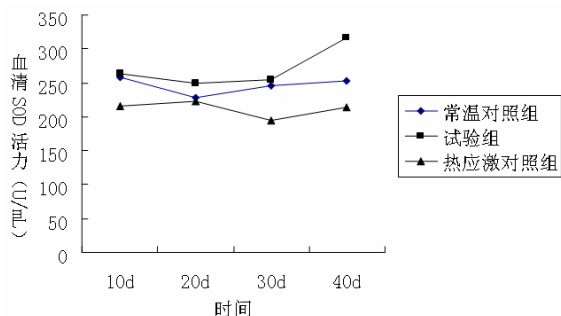


图 1 血清 SOD 活力变化图

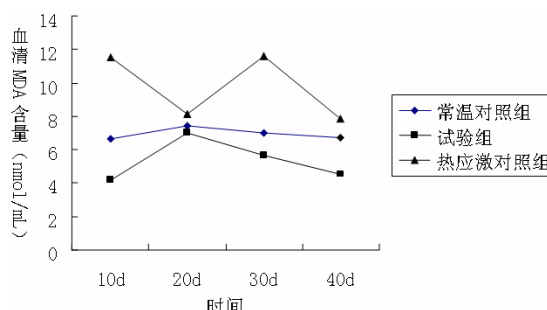


图 2 血清 MDA 含量变化图

表 2 血清中 MDA 含量

单位: nmol/mL

组别	10d	20d	30d	40d
常温对照组	6.68±0.83 ^{ab}	7.40±1.42	7.00±0.46 ^b	6.74±1.72
试验组	4.16±0.32 ^b	6.99±1.43	5.64±0.38 ^b	4.52±1.09
热应激对照组	11.56±1.56 ^A	8.11±1.14	11.60±2.47 ^a	7.85±0.36

表 3 血清中 GSH-Px 的活力

组别	10d	20d	30d	40d
常温对照组	767.5±29.8 ^{ba}	741.4±13.0	750.1±19.2 ^{ab}	780.3±26.1
试验组	833.1±14.7 ^{ba}	784.6±13.0	790.8±26.3 ^a	740.1±41.2
热应激对照组	621.5±69.4 ^{bb}	743.2±28.5	711.4±31.2 ^b	667.1±76.0

于常温对照组和试验组, 在 10 d 常温对照组显著高于热应激对照组 (P < 0.05), 试验组极显著高于热应激对照组 (P < 0.01), 在 30 d 试验组显著高于热应激对照组 (P < 0.05), 其余时间各组间有差异但不显著 (P > 0.05)。

3 讨论与小结

3.1 自由基是机体代谢过程中产生的一类内源性物质, 适量的自由基在杀灭细菌、调节免疫力等方面起着重要作用。但在某些病理情况下, 机体内自由基的量明显增多, 对生物大分子产生超氧化反应, 从而导致细胞结构和功能的改变, 这是引起许多疾病发生的重要原因。研究表明, 过量的自由基能造成机体免疫功能紊乱^[3]。动物体内存在着有效地清除自由基的抗氧化酶系统, 其中主要的有 GSH-Px、SOD 等。MDA 是自由基作用于生物膜中

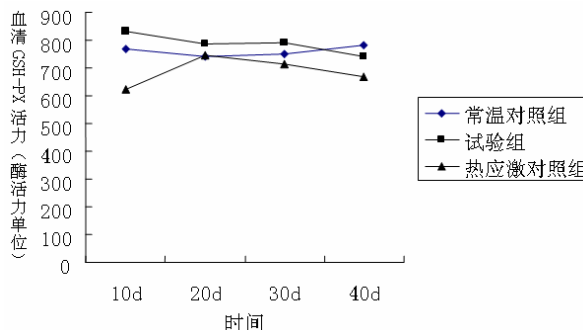


图 3 血清 GSH-Px 活力变化图

的多不饱和脂肪酸 (PUFA) 引发的脂质过氧化作用而产生的脂质过氧化物, MDA 含量的多少可显示脂质过氧化作用程度的大小, 间接反映出细胞结构的受损害程度^[4,5]。

(下转第 44 页)

氟苯尼考与多种抗菌药物联合应用对大肠杆菌的体外抑菌试验

江 丽¹, 雷淑珍²

(1. 广州市海珠区动物防疫监督所, 广东 广州 510310; 2. 广东省农科集团前沿动物保健有限公司, 广东 广州 510640)

摘要: 为了解氟苯尼考分别与恩诺沙星、TMP 和多西环素联合用药的体外抑菌效果, 本试验采用倍比稀释法, 测定了氟苯尼考、恩诺沙星、TMP 和多西环素对大肠杆菌 O_{78} 的最小抑菌浓度 (MIC); 采用棋盘法进行恩诺沙星、TMP、多西环素分别与氟苯尼考联合应用对大肠杆菌的药敏试验。结果表明: 四种抗菌药物都有较强的抑菌能力, 氟苯尼考 MIC 为 $4 \mu\text{g/mL}$, 恩诺沙星 MIC 为 $0.1 \mu\text{g/mL}$, TMP 的 MIC 为 $16 \mu\text{g/mL}$, 多西环素的 MIC 为 $4 \mu\text{g/mL}$ 。氟苯尼考与恩诺沙星联合表现为无关作用, 与 TMP 联合表现为协同作用, 与多西环素联合表现为累加作用。

关键词: 氟苯尼考; 大肠杆菌; 联合药敏试验

中图分类号: S859.79⁶

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0042-03

氟苯尼考 (florfenicol, 氟甲砜霉素) 是新一代氯霉素类兽医专用广谱抗生素, 其化学名称为 D (+) 苏 1-对甲砜基苯基-2-二氯乙酰氨基-3-氟丙醇, 是甲砜霉素 (Thiamphenicol) 单氟衍生物。该药自 20 世纪 90 年代陆续在日本、欧美及中国等上市以来, 主要用于防治牛、猪及水产类动物的细菌性感染。对敏感菌的抗菌活性与氯霉素和甲砜霉素相似, 但对耐氯霉素及甲砜霉素的细菌仍然敏感。由于氯霉素有严重的致再生障碍性贫血的不良反应, 在美国已禁止用于食品动物。研究表明, 氯霉素的化学结构中芳香环上对位硝基是引起再生障碍性贫血的主要基团, 氟苯尼考在化学结构上以 CH_3SO_2 取代了 NO_2 , 用药后不产生再生障碍性贫血的不良反应^[1]。因此, 在动物的疾病防治上, 尤其是食品动物, 氟苯尼考具有广阔的应用前景。本实验采用棋盘法进行体外联合药敏试验, 旨在探讨氟苯尼考分别与恩诺沙星、TMP、多西环素联合用药对大肠杆菌的体外抑菌效果, 为临床上防治大肠杆菌病提供资料, 避免长期单一用药或盲目联合用药引起耐药菌株的产生, 从而有效防治大肠杆菌病。

1 材料与方 法

1.1 材料 氟苯尼考 (99.3%)、恩诺沙星 (99.0%)、乳酸 TMP (88.3%)、多西环素 (90.2%)、氢氧化钠、乙酸、大肠杆菌 O_{78} (由中国兽药监察所提供)。

1.2 方 法

1.2.1 试 管 法

1.2.1.1 药物原液的配制 用电子天平称取各种

药物, 无菌操作将各种药物用适宜的溶剂溶解, 稀释成 $1280 \mu\text{g/mL}$ 。氟苯尼考: 称取 0.0646 g, 用无水乙醇滴加振摇至完全溶解, 以蒸馏水定容到 50 mL。恩诺沙星: 称取 0.0647 g, 用 10% 乙酸加振摇至完全溶解, 以蒸馏水定容到 50 mL; TMP: 称取 0.0725 g, 以蒸馏水溶解, 定容到 50 mL; 多西环素: 称取 0.0710 g, 以蒸馏水溶解, 定容到 50 mL。以上各药以 5 mL 分装于各干燥无菌小瓶中, 于 -20°C 低温保存, 每次取出一瓶保存于 4°C 备用, 使用期限为一周^[2]。

1.2.1.2 操作方法 将菌液用营养肉汤作 1:100 稀释, 然后在 13 支无菌加塞的试管中, 在第一管中加入稀释后的菌液 1.8 mL, 其余各管均加入稀释后的菌液 1 mL。然后于第 1 管内加入抗菌药物原液 ($1280 \mu\text{g/mL}$) 0.2 mL, 混合后吸出 1 mL 加入第 2 管中, 用同样的方法依次稀释至第 12 管, 弃去 1 mL。第 13 管为生长对照。第 1 管中的药物浓度为原液的 1/10, 第 2 管为第 1 管的 1/2, 如此类推。另外, 由于恩诺沙星的 MIC 较低, 因而先将原液作 1:10 稀释后再吸取 0.2 mL ($128 \mu\text{g/mL}$) 稀释药液加入第 1 管中, 余下操作步骤与前面所述过程相同。于 37°C 培养 16~18 h, 每个药物作双样品测定, 以无菌生长的最低浓度为最低抑菌浓度。

1.2.2 棋 盘 法 联 合 药 敏 试 验

1.2.2.1 药物的稀释 用已稀释的菌液稀释各种药物: 氟苯尼考: 吸取 0.7 mL 药物原液与 13.3 mL 稀释菌液混和于小三角烧瓶中, 得含菌的药液浓度

为 64 μg/mL, 共 14 mL。恩诺沙星: 吸取 0.1 mL 药物原液与 0.9 mL 稀释菌液于试管①中混合 (得浓度为 128 μg/mL), 在试管①中吸取 0.1 mL 药液与 15.9 mL 稀释液于小三角烧瓶中混合 (得浓度为 0.8 μg/mL), 弃去 2 mL, 小三角烧瓶中共为 14 mL。TMP: 吸取 1.4 mL 药物原液与 12.6 mL 稀释菌液于小三角瓶中混合, 得含菌的药液浓度为 128 μg/mL, 共 14 mL。多西环素: 吸取 0.4 mL 药物原液与 15.6 mL 稀释菌液于小三角瓶中混合后弃去 2 mL, 得含菌的药液浓度为 32 μg/mL, 共 14 mL。

1.2.2.2 操作方法 测定各药物单独对 O₇₈ 的 MIC 后, 分别以 TMP、多西环素两药 MIC 的 4、2、1 倍以及 MIC 的 1/2、1/4、1/8 倍分别进行联合^[3]。以氟苯尼考与恩诺沙星为例: 在试管架排 7 排试管, 每排 7 管, 共 49 管。于第 1 横排中每管加入含菌的氟苯

尼考药液 1 mL, 共 7 mL, 再加稀释菌液混匀, 加入第 2 排, 每管 1 mL; 同法依次加至第 6 排, 第 7 排为对照, 不加恩诺沙星。两药的对照管再加入 1 mL 肉汤, 另设一支 2 mL 的含菌肉汤作对照, 用于检验细菌活性。37℃ 培养 16~18 h, 观察结果。

2 结果

2.1 试管法结果 五种抗菌药物对大肠杆菌的 MIC (μg/mL) 分别为: 氟苯尼考 8 μg/mL, 恩诺沙星 0.1 μg/mL, TMP 16 μg/mL, 多西环素 4 μg/mL。

2.2 联合药敏试验结果 见表 1、表 2、表 3。结果用氟苯尼考 FIC 指数作为联合药敏试验的判断依据: 氟苯尼考 FIC 指数 = (甲药联合时的 MIC/甲药单独时的 MIC) + (乙药联合时的 MIC/乙药单独时的 MIC); 氟苯尼考 FIC 指数 ≤ 0.5, 协同作用; 氟苯尼考 FIC 指数 > 0.5~1, 相加 (累加) 作用;

表 1 氟苯尼考与恩诺沙星的联合药敏试验结果

药物	浓度	氟苯尼考 (μg/mL)						恩诺沙星单药对照
		32	16	8	4	2	1	
恩诺沙星 (μg/mL)	0.4	-	-	-	-	-	-	-
	0.2	-	-	-	-	-	-	-
	0.1	-	-	-	-	-	-	-
	0.05	-	-	-	-	-	+	+
	0.025	-	-	-	-	+	+	+
	0.0125	-	-	-	-	+	+	+
氟苯尼考单药对照		-	-	-	-	+	+	+

氟苯尼考 FIC 指数 = 2, 无关作用。

表 2 氟苯尼考与 TMP 的联合药敏试验

药物	浓度	氟苯尼考 (μg/mL)						TMP 单药对照
		32	16	8	4	2	1	
TMP (μg/mL)	64	-	-	-	-	-	-	-
	32	-	-	-	-	-	-	+
	16	-	-	-	-	-	-	+
	8	-	-	-	-	-	-	+
	4	-	-	-	-	-	+	+
	2	-	-	-	-	-	+	+
氟苯尼考单药对照		-	-	-	+	+	+	+

氟苯尼考 FIC 指数 = 0.47, 协同作用。

表 3 氟苯尼考与多西环素的联合药敏试验

药物	浓度	氟苯尼考 (μg/mL)						多西环素单药对照
		32	16	8	4	2	1	
多西环素 (μg/mL)	16	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	+	+
	0.5	-	-	-	-	-	+	+
氟苯尼考单药对照		-	-	-	-	+	+	+

氟苯尼考 FIC 指数 = 1, 累加作用。

氟苯尼考 FIC 指数 $>1\sim 2$, 无关作用; 氟苯尼考 FIC 指数 >2 , 拮抗作用。

3 讨论

在制剂生产上, 为了得到抗菌增效的配方, 常进行两种或两种以上的抗菌药物复方制剂的筛选。联合用药更重要是在临床的应用, 如用于尚未确定是由何种细菌引起的急、重症感染的经验治疗及治疗多种细菌所引起的混合感染等。抗菌药物联合应用的效果可出现错综复杂的情况。总的可分为协同作用、累加作用、拮抗作用、无关作用。近年来耐药菌株的大量出现, 以前不少有效的抗菌药物都已失效。大肠杆菌在遗传特异性上的变异很多都是可以转移的, 尤其是耐药性的转移更为严重^[3]。

本次采取棋盘法进行对大肠杆菌的体外抑菌试验, 进行两种药物联合药敏试验, 这种方法有其他联合药敏方法所不可比拟的优点, 主要在于棋盘法中联合的两种药物的每个药物浓度都有单独和另一个药物的不同浓度的联合, 因此能精确测定两种抗菌药物在适当浓度的比例下所产生的相互作用, 对联合用药中各药物含量的比例制定有一定的指导作用。实验在体外环境下进行, 因此会受到体外的一些因素的影响。影响体外抑菌试验结果的因素很多, 如培养基成分、培养条件、接种浓度等。在实验过程中, 确保无菌操作, 避免受到

其它细菌的污染。因此, 要尽量保证培养基、培养温度和观察结果时间一致, 以保证实验结果有较好的重复性。

从本实验结果看, 四种药物对大肠杆菌 O_{78} 都有较强的抑制作用: 氟苯尼考的 MIC 为 $4\mu\text{g/mL}$, 恩诺沙星为 $0.1\mu\text{g/mL}$, TMP 为 $16\mu\text{g/mL}$, 多西环素为 $4\mu\text{g/mL}$ 。利用氟苯尼考 FIC 指数公式可算出两种药物联合的作用效果。由表 1 可看出: 氟苯尼考与恩诺沙星联合得到氟苯尼考 FIC 指数为 2, 表现为无关作用; 由表 2 可看出氟苯尼考与 TMP 联合得到氟苯尼考 FIC 指数为 0.47, 小于 0.5, 表现为协同作用; 由表 3 可看出氟苯尼考与多西环素联合得到氟苯尼考 FIC 指数为 1, 表现为累加作用。

综合试验结果, 氟苯尼考与恩诺沙星在临床上最好不作联合用药, 而氟苯尼考与 TMP、多西环素联合应用有一定价值。但由于这是初步试验结果, 且本试验仅限于实验室结果, 要确定其对禽类大肠杆菌病的联合防治效果, 需作进一步的临床体内试验和研究。

参考文献:

- [1] 冯洪辉. 兽医药理学[M]. 广州: 华南农业大学出版社, 1994.
- [2] 沈阳学院药剂教研组. 常用药物制剂[M]. 辽宁: 辽宁人民出版社, 1979.
- [3] 戴自英. 临床抗菌药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985.

(上接第 41 页)

3.2 本研究结果表明, 热应激下的肉鸡, 其血清 GSH-Px、SOD 活性低于正常对照组, MDA 含量则较正常对照组上升。热应激在 10 d 时对 GSH-Px 活性抑制明显 ($P<0.05$), 在 30 d 时 MDA 含量增长明显 ($P<0.05$), 其中热应激对 GSH-Px 活性的抑制作用强于对 SOD 活性的抑制作用。

3.3 本研究结果还证实, 以黄芪、党参为主要药物的中药方剂, 能提高正常肉鸡 GSH-Px 和 SOD 活性, 降低血清 MDA 的含量。该方剂还能对抗热应激所致的肉鸡血清 GSH-Px、SOD 活性下降和血清 MDA 含量升高。试验说明, 复方中药具有较显著抗自由基损伤的作用, 有效地清除体内过多的自由基。复方中药中的主药是黄芪, 黄芪的主要活性成分黄芪总黄酮、黄芪总皂甙具有较好的清除机体氧自由基的能力^[6]。该复方中药选用黄芪、党

参等免疫增强效应较为肯定的中药作为方剂的主要成份^[3], 其清除氧自由基的作用可能是它能增强机体免疫力的机制之一。

参考文献:

- [1] 安立龙, 效梅, 王秋芳, 等. 抗热应激添加剂对蛋鸡生产性能的影响[J]. 家畜生态, 2000, 21(2): 15-19.
- [2] 蔡玉根, 梁孙义, 罗上鸿, 等. 家禽热应激缓解物质的应用[J]. 中国畜牧杂, 1994, 30(6): 50-51.
- [3] 赵泳苹. 中药在清除体内自由基上的作用[J]. 湖南中医杂志, 1996, 12(5): 48-49.
- [4] 刘国艳, 柴春彦, 吕世文, 等. 铬-132 对高氟低硒地区奶牛自由基代谢的影响[J]. 中国兽医杂志, 2000, 26(3): 10-13.
- [5] Mo J, Fan J J, Guo Z R, et al. A new hypothesis about the relationship between free radical reactions and hemorheological properties in vivo[J]. Medical Hypotheses, 1993, 41: 516-520.
- [6] 汪德清, 沈文海, 田亚平, 等. 黄芪 3 种提取成分对氧自由基作用的影响[J]. 中国药理学通报, 1994, 10(2): 263-265.

猪链球菌病灭活疫苗(2型, HA9801株)的研制(二) ——疫苗免疫效力的研究

杨 球, 游启有, 以体强, 王少英, 林旭埜, 张毓金
(广东永顺生物制药有限公司, 广东 广州 511356)

摘要: 通过采用实验室研制的猪链球菌病灭活疫苗(2型, HA9801株)对猪的免疫攻毒试验, 以及对免疫后不同时间血清抗体的检测等研究试验, 制定了最佳免疫程序, 证明了该疫苗对猪有较好的免疫保护力; 检验用猪品系的筛选, 结果显示广东两种土种猪敏感可靠; 攻毒用强毒株的筛选, 试验结果表明, 使用SC-6株为攻毒菌株, 结果呈现规律性。

关键词: 猪链球菌病2型; 疫苗效力

中图分类号: S852.61*1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0045-03

1 材料和方法

1.1 菌种 制苗用菌种为HA9801株, 系南京农业大学从链球菌病死猪分离的猪链球菌2型, 由南京农业大学鉴定和保管; 攻毒用菌种为SC-6, 系中国兽医药品监察所2005年从四川省资阳地区急性败血症死亡猪体内分离, 由中国兽医药品监察所鉴定、保存及提供。

1.2 试验用疫苗 实验室研制的猪链球菌病灭活疫苗(2型, HA9801株), 批号分别为200501、200502、200503, 经无菌检验、物理性状检验合格后用于试验。

1.3 试验动物的筛选及攻毒用菌株的选择 使用1-3月龄无猪链球菌抗体的广东土猪四个品系: 土猪L、土猪D、土猪X、土猪Z, 将HA9801、SC-6毒株分别培养、活菌计数后, 以不同剂量攻毒, 根据结果作出相应的选择。

1.4 血清检测方法 以表达MRP包被酶标板, 以间接ELISA方法检测抗体。

1.5 HA9801株与SC-6株免疫交叉攻毒试验 分别以HA9801株及SC-6株制备的疫苗(每头份含菌数为20亿个), 以常规剂量免疫广东土猪L, 21天后同时以HA9801株及SC-6株攻击, 以测定两株菌间的免疫交叉情况。

1.6 常规剂量的血清抗体消长规律的测定及攻毒试验 用猪链球菌病灭活疫苗(2型, HA9801

株)肌肉注射仔猪, 每头2 mL, 免疫后每7天抽血1次, 分离血清, 测定其ELISA抗体, 制定抗体消长曲线, 观察抗体消长规律, 见图1、2、3。并于免疫后60、90、120天攻毒。

1.7 不同免疫剂量的免疫攻毒保护试验及攻毒时的血清ELISA抗体测定 取18头仔猪, 分为4组, 免疫组每组5头, 对照组3头。用猪链球菌病灭活疫苗(2型, HA9801株)分别免疫, 免疫剂量为1 mL、2 mL、4 mL, 1组作为对照。免疫21天后, 一起攻击致死剂量的SC-6株活菌。攻毒结果见表2、3、4, 同时抽血分离血清, 测定ELISA抗体。观察15天。

1.8 免疫持续期试验 用猪链球菌病灭活疫苗(2型, HA9801株)2 mL/头免疫仔猪6组, 另设18头作对照, 其中3组首免14天后以相同剂量进行二免, 然后分别于首免后第60、90、120天抽血检测血清抗体, 尔后攻击强毒SC-6株。见表5。

1.9 最小免疫剂量的测定以及14天二免对21天、28天攻毒效果的影响

1.9.1 将研制的HA9801株疫苗200501、200502、200503批灭活后的菌液(分别为20、21、24亿/mL)0.25 mL、0.50 mL、1.0 mL、1.50 mL(免疫猪只时以铝胶生理盐水补足2 mL), 每批共4组疫苗。

1.9.2 选用1~3月龄广东土X猪80头, 平均分为16组, 分组依次肌肉注射上述各组疫苗。免疫21天后, 连同相同条件的对照猪3头, 同时静脉攻

收稿日期: 2008-04-29

基金项目: 粤港关键领域重点突破项目(2005A10905006)

广东省科技攻关重点项目(2006Z2-E0071)

击 SC-6 株, 攻毒剂量为致死剂量。

1.9.3 选用 1-3 月龄广东土 X 猪 26 头, 其中一组 10 头各肌肉注射 200501 批常规剂量, 另一组 10 头各肌肉注射 200501 批常规剂量后 14 天, 以相同剂量进行二免, 剩下 6 头用作对照猪。于两组免疫 21 天、28 天时, 每组各取 5 头, 连同条件相同的对照猪 3 头, 攻击强毒 SC-6 株。

1.10 疫苗产生坚强免疫力的最早时间测定 用猪链球菌病灭活疫苗 (2 型, HA9801 株) 200501、200502、200503 以常规剂量免疫易感猪后, 分别在免疫后 10 天、15 天、21 天、28 天静脉攻击强毒 SC-6 株致死剂量, 观察免疫力产生时间。

2 结果

2.1 血清抗体消长规律 疫苗免疫后, 在第 7 天就能检测到其 ELISA 抗体, 至第 35 天达到高峰, 抗体水平可维持到第 90 天 (见图 1)。(注: OD 值 ≥ 0.244 为阳性)

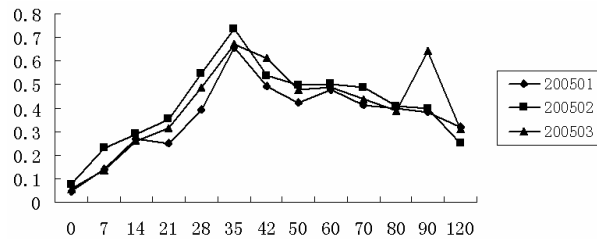


图 1 三批疫苗血清抗体消长规律

表 1 常规剂量免疫攻毒结果

天数	免疫头数	攻毒剂量	免疫保护			对照死亡
			200501	200502	200503	
60	5	致死剂量	5/5	5/5	5/5	3/3
90	5	致死剂量	4/5	5/5	4/5	3/3
120	5	致死剂量	4/5	3/5	4/5	2/3

从试验结果可以看出, 按常规剂量免疫攻毒结果理想, 免疫猪 4/5 以上健活, 对照猪 2/3 以上死亡。

2.2 试验动物的筛选及攻毒用菌株的选择 从试验动物的筛选及攻毒用菌株选择的试验结果可看出: SC-6 株比 HA9801 株毒力强, 而且呈现较好的规律性, 比如对于土猪 X, SC-6 及 HA9801 株的 MLD 分别为 50 万、500 万 CFU, 因此我们选定 SC-6 株为攻毒菌株。

从广东土猪四个品系土猪 L、土猪 D、土猪 X、土猪 Z 的攻毒结果可以看出, 土猪 X 及土猪 L 最敏感, 最终选定为试验动物。

结果 1 攻击 SC-6 株的情况

品系	2.0×10^9	1.0×10^8	5.0×10^7	1.0×10^7	5.0×10^6
土猪 L	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
土猪 D	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5
土猪 X	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
土猪 Z	5/5	4/5	5/5	2/5	1/5

结果 2 攻击 HA9801 株的情况

品系	2.0×10^9	1.0×10^8	5.0×10^7	1.0×10^7	5.0×10^6
土猪 L	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5
土猪 D	5/5	2/5	3/5	2/5	1/5
土猪 X	5/5	5/5	5/5	2/5	1/5
土猪 Z	1/5	2/5	0/5	1/5	0/5

2.3 不同免疫剂量的攻毒保护 3 批疫苗的 1 mL 组的保护率分别为 40%、60%、40%, 总保护率为 46.67%; 2 mL 组的保护率分别为 80%、80%、100%, 总保护率为 86.67%; 4 mL 组的保护率分别为 100%、100%、100%, 总保护率为 100%。根据 200501、200502、200503 三批疫苗 2mL 免疫的攻毒保护情况, 效力检验中免疫猪的健活数量定为 4/5 以上, 对照组定为死亡 2/3 以上。

表 2 200501 批免疫攻毒保护试验结果

剂量	免疫头数	攻毒剂量	免疫保护	对照死亡
1 mL	5	致死剂量	2/5	3/3
2 mL	5	致死剂量	4/5	2/3
4 mL	5	致死剂量	5/5	2/3

表 3 200502 批免疫攻毒保护试验结果

剂量	免疫头数	攻毒剂量	免疫保护	对照死亡
1 mL	5	致死剂量	3/5	2/3
2 mL	5	致死剂量	4/5	2/3
4 mL	5	致死剂量	5/5	3/3

表 4 200503 批免疫攻毒保护试验结果

剂量	免疫头数	攻毒剂量	免疫保护	对照死亡
1 mL	5	致死剂量	2/5	2/3
2 mL	5	致死剂量	4/5	2/3
4 mL	5	致死剂量	5/5	3/3

2.4 HA9801 株与 SC-6 株免疫交叉攻毒试验结果 见表 5。从 HA9801 株与 SC-6 株免疫交叉攻毒试验结果可以看出, HA9801 株与 SC-6 株免疫原性一致。HA9801 株是南京农大 1998 年分离、鉴定, 作了全面深入的研究, 从本试验结果看, 其是一株免疫原性良好的疫苗株, 宜选取为制苗菌株。

2.5 免疫持续期试验 经过二免后, 仔猪的血清抗体在第 60、90、120 天分别为 0.639、0.715、0.542 (注: OD 值 ≥ 0.244 为阳性)。单次免疫的保

表5 HA9801株与SC-6株免疫交叉攻毒试验结果

疫苗	攻击HA9801(剂量 1.0×10^7)		攻击SC-6(剂量 10.0×10^6)	
	免疫保护	对照死亡	免疫保护	对照死亡
HA9801	5/5	2/3	5/5	3/3
SC-6	5/5	3/3	5/5	3/3

表6 免疫持续期试验攻毒单次免疫后的结果

天数	免疫头数	攻毒剂量	免疫保护			对照死亡
			200501	200502	200503	
60	5	致死剂量	5/5	5/5	5/5	3/3
90	5	致死剂量	4/5	5/5	4/5	3/3
120	5	致死剂量	4/5	3/5	4/5	2/3

表7 免疫持续期试验攻毒二次免疫后的结果

天数	免疫头数	攻毒剂量	免疫保护			对照死亡
			200501	200502	200503	
60	5	致死剂量	5/5	5/5	5/5	3/3
90	5	致死剂量	5/5	5/5	4/5	3/3
120	5	致死剂量	4/5	5/5	4/5	2/3

护率为80.00%,二免后的保护率为86.67%。二免效果比单免好。

2.6 免疫持续期试验攻毒二次免疫后的结果见表7。

2.7 最小免疫剂量测定以及14天二免对21天、28天攻毒效果的试验结果 结果表明(表8、表9),每头剂量含菌数10亿以上时,攻击强毒,才能达到较好的免疫效果。为了保证免疫效果,配苗时每头份含菌数不少于20亿。

为了取得较好的免疫效果,有必要在首免后14天以相同剂量进行二免。

表8 最小免疫剂量测定

批号	0.25mL/头	0.5mL/头	1mL/头	1.5mL/头	对照
200501	1/5	3/5	4/5	5/5	3/3死亡
200502	1/5	2/5	5/5	5/5	3/3死亡
200503	1/5	4/5	5/5	4/5	3/3死亡

表9 首免14天后二免对21天、28天攻毒效果的测定

组别	21天	28天
常规剂量	4/5保护	4/5保护
14天二免	5/5保护	5/5保护
对照组	3/3死亡	2/3死亡

表10 坚强免疫力产生时间测定结果

天数	免疫头数	攻毒剂量	免疫保护			对照死亡
			200501	200502	200503	
10	5	致死剂量	1/5	2/5	1/5	3/3
15	5	致死剂量	3/5	4/5	4/5	3/3
21	5	致死剂量	4/5	5/5	5/5	2/3
28	5	致死剂量	5/5	5/5	4/5	3/3

2.8 坚强免疫力产生时间测定结果 从试验结果可以看出,免疫后21天,才能取得较好的保护效果。见表10。

3 讨论

3.1 根据以上研究,猪链球菌灭活疫苗对试验猪有良好的免疫效果,疫苗产生免疫快,有效抗体维持时间长。

3.2 根据以上试验结果,免疫程序建议为:3周龄仔猪与中大猪首免2mL,于首免14天后以相同剂量进行二免。

春季全国重大动物疫病免疫情况大检查工作全面开展

5月19日,按照农业部的要求,中国动物疫病预防控制中心在北京召开了2008年春季全国重大动物疫病免疫情况大检查工作部署会议,检查活动全面启动。中国动物疫病预防控制中心徐百万副主任、农业部兽医局长长江处长出席了会议并讲话,会议由中国动物疫病预防控制中心防控应急处王宏伟处长主持。全国(除四川、重庆、甘肃、陕西、云南等5个省(市)外)各省、自治区、直辖市抽调的检查人员约70多人参加了检查工作部署会议。

会上,中国动物疫病预防控制中心徐百万副主任对当前新的政治形势、防疫形势作了全面分析,特别强调了当前防疫工作和抗震救灾是重点工作,对这次检查的工作任务提出了明确的要求,要求检查组要以高度负责的精神、求真务实的工作作风和科学严谨、公平公正的态度,认真做好这次检查工作,了解各地疫病防控的真实情况,总结经验,发现问题,督促指导各地按照农业部的部署,进一步做好当前的各项防疫工作,特别是春季集中免疫后的差漏补缺和补免工作,为确保奥运会期间不发生重大动物疫情、不发生畜产品质量安全事件,为有力支持灾区的抗震救灾和重建工作尽到责任,做出贡献。会上,兽医局长长江处长通报了今年全国重大动物疫情和这次四川汶川大地震给灾区动物养殖业造成的损失,农业部领导高度重视重大动物疫病的防疫工作,就当前抗震救灾的特殊时期,同时对全国范围内进行春季重大动物疫病免疫情况的检查工作的重要性做了说明,希望通过这次检查,使农业部能及时掌握各地重大动物疫病防控开展情况,有针对性地指导各地做好重大动物疫病防控工作。

会议对全国大检查工作进行了统一安排和详细部署。会后,各检查组将分赴各地开始指导重大动物疫病防控情况的检查工作。(信息来源:中国动物疫病预防控制中心)

中国沙皮犬的起源、品种分化历程与保护

刘清神

(华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 本文对中国沙皮犬的起源及其在美国、香港等地的品种分化、延续历程作了较为细致的阐述, 分析了沙皮犬在品种分化与延续过程中存在的问题, 并就保护这一濒临灭绝的世界名犬提出了建议。

关键词: 中国沙皮犬; 起源; 分化与延续

中图分类号: S829.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0048-03

1 中国沙皮犬的起源

作为世界名犬, 中国沙皮犬 (Chinese Shar-pei) 是一种十分古老而独特的品种。相传秦汉时期 (约公元前 200 年) 沙皮犬已存在于我国南方, 出现在汉朝绘画中的沙皮犬与现代的沙皮犬十分相似, 只不过体型比现在的稍大。从汉墓中发掘出来的沙皮犬塑像也可作为一种证据, 这种用泥土做的塑像具有多皮肤褶皱的头部、卷尾和正方形的体形。关于该犬的起源, 目前存在许多推测: 有人认为来源于南海大沥当地的土犬 (当时称为唐狗); 有人认为由短毛松狮犬演变而来, 因为沙皮犬和松狮犬存在于同一时代, 而且这两个犬种在外观和结构上有着惊人的相似, 如两者都有着紫色的舌头; 另有人认为沙皮犬是由古代獒犬 (即现在藏獒的祖先) 演变而来的; 由于沙皮犬也有双残留趾 (double dewclaws), 故有人认为沙皮犬可能含有大白熊犬 (Great pyrenees) 的血缘^[1]; 还有人认为沙皮犬是北方的哈巴犬传至广东南海后, 经当地居民长期选育而成^[2]。

无论上述推测结果如何, 广东省佛山市南海区大沥镇作为现代中国沙皮犬的起源地是公认的。因为大沥斗犬是现代中国沙皮犬血缘比较近的祖先, 养沙皮犬作为狩猎犬和斗犬的传统在大沥已经延续了 500 多年, 乾隆年间就出现了带有类似沙皮犬的斗犬图案的陶瓷。过去, 沙皮犬曾是一种优良的狩猎犬。作为斗犬, 沙皮犬在结构上很适合这种“运动”, 其强有力的双颌可以完全咬住对手, 而它那粗糙的毛质却能防止对手袭击, 因对

手会发现将沙皮犬如刺一样的被毛咬在口中非常难受, 而且当从后面咬住沙皮犬时, 因其厚而松弛的皮肤可保护深部组织不易受损, 沙皮犬反而能轻而易举地回头撕咬对手。此外, 沙皮犬的小耳朵不易被对手抓伤, 其深邃的眼睛也不易受伤等, 所有这些优势使沙皮犬成为犬只打斗的常胜将军。

2 沙皮犬的品种延续历程

2.1 沙皮犬在美国 1973 年以前, 中国沙皮犬在美国的记录极少, 且血统记录也非常不完整。此前最早记录的是香港 C. M. Chung 先生的一只名叫“Lucky”的犬, 于 1966 年出口到美国。此后, 还有几只沙皮犬出口的零星记录。早在 1971 年以前, 美国繁殖者协会曾把这一犬种登记为中国斗犬 (Chinese Fighting Dog), 但那时并不被很多人知晓, 感兴趣的人也寥寥无几。此种状况一直持续到 1973 年, 香港的罗锡壕先生在“Dogs”杂志上发表了“Chinese Fighting Dogs”文章, 希望美国能拯救这一濒临灭绝的稀有犬种, 沙皮犬开始引起美国有关方面的注意, 并开始了从香港、台湾和澳门等地真正意义上的进口。那时, 出口到美国的沙皮犬外形差异较大。1974 年 4 月, 美国俄勒冈州 (Oregon) 维达市成立了美国沙皮犬俱乐部 (CSPCA), 其主要目标就是使沙皮犬获得美国养犬俱乐部 (AKC) 的认可。此间 AKC 与香港港九狗会 (HKKKA) 保持着联系, 确定了中国沙皮犬的官方品种名称, 制订了沙皮犬的品种标准。1976 年 11 月 9 日, 美国的第一份沙皮犬血统证书出现。至 1978 年, 沙皮犬在北美洲总共仅有 145 条的记

录(其中 92 条注册),因此当年被列为吉尼斯世界记录中的“世界最稀有犬种”头衔。此后欧美掀起饲养中国沙皮犬的热潮,吸引了美国成千上万的犬迷,沙皮犬饲养人数与犬的数量明显增加。1978 年,在伊利诺斯州举办了美国第一届沙皮犬单独展,并在此后的每年都举办。1982 年,CSPCA 为沙皮犬制定了官方标准并历经修改,出版了介绍沙皮犬多种杂志及专门书籍,确定只有达到标准要求沙皮犬,方能获得俱乐部承认并予以注册。至 1988 年美国境内已有 29 263 只沙皮犬,其数量比中国(包括香港)的还要多,而会员至 1987 年 4 月已达到 5 497 人。1988 年 5 月 4 日,AKC 正式接受肉嘴型沙皮犬,将其列为其他犬类别(Miscellaneous Class)。1992 年 8 月 1 日将其归类于非运动组(Non-sporting group),正式承认沙皮犬为一新品种,并于同年 10 月 8 日批准了肉嘴型沙皮犬标准。1998 年,AKC 对肉嘴型沙皮犬标准进行了少许改动,并于 6 月 12 日再次予以确认。目前,沙皮犬俱乐部遍布美国各州,会员数千;正式注册的沙皮犬超过万只,分布于全美各地。沙皮犬每一次单独展能吸引 60~100 只的参赛,而年度展便会吸引几百只沙皮犬参加比赛。由此可见,美国的沙皮犬饲养者为延续此优良品种做了一定的努力,所以美国作为沙皮犬的第二故乡确是名不虚传。作者在亚玛逊网站(<http://www.amazon.com>)上搜索与 Chinese Shar-pei 有关的书籍,能够显示出 231 项结果,其中前 30 本书均与沙皮犬直接相关。我国至今缺乏专门介绍沙皮犬的专著,而在中国期刊网和维普网上能够搜索到的有关沙皮犬的文章仅 50 余篇,且多数是对沙皮犬的简单介绍和描述。

2.2 沙皮犬在英国等国 沙皮犬在美国以外的其它国家数量不多,但英国、澳大利亚、新西兰、加拿大、南非和日本等国都有饲养。英国的第一只沙皮犬是于 1981 年由美国进口的,此后分别从香港和美国又陆续进口到英国一些。1982 年,英国沙皮犬俱乐部成立,并于 1984 年首次出版“The Wrinkle”杂志,以专门介绍中国沙皮犬。1986 年,英国沙皮犬俱乐部获得英国养犬俱乐部(KC)的承认。

2.3 沙皮犬在香港地区 沙皮犬起源于中国大

沥,但无疑是通过香港介绍给世界的。上世纪五、六十年代,一些沙皮犬通过边境走私到了香港、澳门和台湾等地,主要作为看家和打斗之用。1960 年中期,沙皮犬起初被香港狗会(HKKC)记录为中国斗犬,并不是中国沙皮犬,直到 1968 年才获得 HKKC 认可。从 60 年代开始,有些人为了保留沙皮犬这一品种而四处搜寻优良的个体,找到后就运到香港进行保种和繁育。这些早期的沙皮犬,是当今世界各地沙皮犬的主要血统来源。有人将十分有限的原种沙皮犬用来与松狮犬、寻血猎犬、斗牛獒、斗牛更、斗牛犬及拳师犬等其它品种犬交配,试图获得沙皮犬原有的体形和增强它的斗性。但同时也存在着近亲繁殖现象。意想不到的是,骨嘴沙皮犬未能得到很好的保存,最终却育成了新型的肉嘴型沙皮犬。但是,肉嘴型沙皮犬以其独特的外形吸引了外国爱好者,尤其在美国更是如此。虽然 HKKC 不承认这个新型的“沙皮犬”,但此间由于 HKKKA 给美国提供了沙皮犬血统证书,结果导致肉嘴型沙皮犬在美国的迅速流行,而骨嘴型沙皮犬则从此面临着不受重视的困境^[3]。几十年来, HKKC 沙皮犬会仍有一群骨嘴型沙皮犬爱好者不为金钱所动,追求真理,坚持骨嘴型沙皮犬的保种和繁殖,因此至今在香港地区还保存着一部分原种沙皮犬。

1975 年, HKKC 曾建议确立传统沙皮犬应具备的一般特征,停止发布肉嘴沙皮犬的系谱证书,并拒绝该品种参加犬展。1975 年以后,香港沙皮犬会制订了传统沙皮犬标准。1994 年,世界畜犬联盟(Federation Cynologique Internationale, FCI) 采纳该标准重新开始发布血统证书。而 HKKKA 则根据 AKC 的肉嘴型沙皮犬标准继续颁发血统证书,并出口沙皮犬至美国等地。

2.4 沙皮犬在中国内地 南海大沥镇作为沙皮犬的原产地,有着传统的繁殖、饲养经验和基础,目前也是经济发达的珠江三角洲中心城镇之一。上世纪五、六十年代,饲养宠物被视为资产阶级的象征,几次打狗运动几乎导致了包括沙皮犬在内的中国纯种犬的灭绝,有关犬的书籍和论文自然非常少,至 70 年代仅有少量的沙皮犬留存。由于长时间封闭,人们对沙皮犬了解得很少,更无从研究,直至 1994 年才陆续出现文献报道。1973-1974

年,香港沙皮犬爱好者开始大量购买,犬价由此上涨,沙皮犬饲养数量随之增多。到了八十年代中期,随着改革开放后人们生活水平的提高,全国宠物热兴起,大沥沙皮犬一时成为犬市的宠儿,当地人不仅把沙皮犬视为宠物,更把其作为促进经济发展的一个品牌,大沥镇出现多家有一定规模的沙皮犬养殖场。这里的每次集市都可售出几十只沙皮幼犬,犬市日益兴旺。本地的原种沙皮犬因与外界隔离,外源基因污染少,种质仍然保持纯正。但随着对外交流日益增多,原种沙皮犬没有得到切实的保护,种质日益受到污染。1989年下半年,第一只肉嘴型沙皮犬从香港运到并对外配种,本地人用骨嘴型沙皮犬与这条肉嘴型沙皮犬交配,得到的杂交犬(象肉嘴沙皮犬)外形更皱,价格更好。由于受利益驱动,肉嘴型沙皮犬在原产地大受欢迎,由此不断从香港运到大沥作为种犬,使大沥沙皮犬出现了骨嘴、肉嘴及两者中间型—骨肉嘴并存和混杂的局面,骨嘴型沙皮犬从此又面临着边缘化的危机。1993年,广东省中国名犬研究会成立,随后于1995年成立了大沥沙皮犬技术研究会,各方以发展经济为目的,在保护原种骨嘴型沙皮犬和饲养肉嘴型沙皮犬方面都做了许多工作,但是受市场的影响,骨嘴型沙皮犬最终未能避免濒临灭绝的现状。可以说在大沥沙皮犬原产地,1989年前全是骨嘴型沙皮犬,而1989年之后几乎成为肉嘴型沙皮犬占绝对优势的局面,且大部分的犬展冠军均为肉嘴型沙皮犬所获。1996年5月25日,首次中国沙皮犬单独展在大沥成功举办,大约有200只沙皮犬参展,这是中国犬业发展史上值得记住的一件大事。1997-1999年期间,以肉嘴型为主导的大沥沙皮犬达到了全盛时期,饲养规模达七、八十只的犬场比比皆是,本地最多存栏数达到两万多只。然而,由于多种原因的影响,自2000年下半年起,沙皮犬饲养形势步入低谷至今。据作者近期在原产地调查采样发现,目前大沥的沙皮犬总数估计在200只左右,而骨嘴型沙皮犬数量更少,难以超过30只,大大低于1978年吉尼斯世界记录“世界最稀有犬种”的145只,不知是否有望再次申请“世界最稀有犬种”?据有关资料,一项名为“中国犬资源调查”的课题现已启动,希望通过该研究能彻底摸清中国犬,包括中国

沙皮犬的现状^[4]。

3 沙皮犬保护的问题与建议

国内关于中国沙皮犬的品种标准历经变动,自1994年开始采用包含肉嘴型在内的双标准,至今又回到骨嘴型沙皮犬标准,但依然存有很多不足,是因国内的大部分沙皮犬属于肉嘴型沙皮犬,不符合该品种标准。基于原产国的原则,FCI早在1994年采纳HKKC于1989年制订的传统沙皮犬标准,但后来因与AKC的1998年肉嘴型沙皮犬标准分歧太大。为了与AKC的标准相适应,1999年FCI重新修订并形成了肉嘴型沙皮犬标准,同时废弃了1994年确定的传统沙皮犬标准^[5]。所以迄今为止,中国原产的骨嘴型沙皮犬在国际上仍然没有得到认可,局面甚是矛盾和尴尬。因此,从保护沙皮犬这一中国的优良犬品种出发,解决其品种分化和标准统一问题是当务之急。

建议有关部门尽快对沙皮犬种质现状进行全面分析和评估,在此基础上,最好将中国沙皮犬分为几个不同的品系/类型,即原产骨嘴类型沙皮犬应属于地方品种,而肉嘴型和骨肉嘴型沙皮犬可属于新培育的沙皮犬品系,并严格保护和利用好骨嘴型沙皮犬这一珍稀的品质资源,以彻底改变广大群众对中国沙皮犬品种认识不一的问题。同时,对大沥、香港两地的骨嘴型沙皮犬进一步收集和保种,制订基因交流计划,进行提纯和改良利用;对各型沙皮犬的育种进行严格监督和指导,禁止沙皮犬与其它品种犬乱配的行为和做法。此外,还须尽快对优质的沙皮犬种质执行类似美国AKC的血统证书制度^[6],建立品种的系谱登记制度、芯片植入制度和管理制度等,以保证中国原产沙皮犬的良性延续及合理利用。

参考文献:

- [1] Juliette Cunliffe. Chinese Shar-Pei [M]. Revised American Edition. Kennel Club Books, Inc. 2003. 8-19.
- [2] 童伟文. 中国名犬. 湖北畜牧兽医, 1994(4): 28.
- [3] 林汉环. 香港沙皮狗会, 2005, <http://www.sharpeiclubhk.com/future.html>.
- [4] 周肖鹏, 李力, 马大君. 让历史悠久的中国名犬走向世界[J]. 中国工作犬业, 2005, (1): 12-14.
- [5] Eric T. Omura, 2006, <http://www.hkshar-pei.com/index.cfm?id=12831&pageid=127#standard>.
- [6] 杨前勇. AKC、SV、UKC的DNA证书[J]. 养犬, 2005, 57(1): 3.

一例猫慢性肾衰的诊治报告

张盼锋, 刘宇

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

中图分类号: S858.293

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)03-0051-02

2007年8月25日笔者于华南农业大学动物医院实习时遇到一例猫慢性肾衰的病例。

1 发病情况

名波波的波斯猫, 六岁, 6 kg。主诉: 一直饲喂猫粮, 最近食欲逐渐降低, 前天开始不食, 大便时干时稀, 小便稍增多, 喝少量水, 精神状态较差, 体重由10 kg逐渐降至6 kg, 后肢无力。在其它动物医院治疗两天后, 不见好转。遂转来我院治疗。

2 临床检查及实验室检查

临床检查: 体温 38.6℃, 呕吐, 呼吸急促, 心音弱, 两后肢无力, 精神差, 皮肤弹性差; 触诊见肝区疼痛明显, 肾脏略有肿大。根据其临床症状及临床上存在一直吃某一品牌猫粮的猫只出现肾衰的现象, 故建议做尿常规检测(见表1)及血液的生化检测(见表2)。

由表1可知: 尿比重很低, 尿蛋白为“++”, 并有白细胞、管型、肾上皮细胞, 这说明肾浓缩能力下降, 肾小球通透性增加, 泌尿系统有炎症。由表2可知: 总蛋白、白蛋白、尿素氮、肌酐钙、磷均升高, 特别是肌酐、尿素氮及磷最能反应肾功能的指标升高明显, 说明肾脏排泄和调节机能失常; 同时谷草转氨酶、谷丙转氨酶及碱性磷酸酶也有一定的升高, 故怀疑在肾功能失常的同时伴有肝功能的异常。

根据临床症状及实验室检测可初步诊断为慢性肾功能衰竭并发肝功能异常。

3 治疗

由于该猫食欲废绝, 营养缺乏, 电解质代谢紊

乱, 故进行对症治疗:

每天给予乳酸林格氏液; 50%的葡萄糖、ATP、辅酶A、地塞米松和维生素C, 用5%的葡萄糖稀释静脉注射; 利用氨苄西林钠等抗生素进行抗菌消炎; 同时为了防治发生酸中毒, 用10%的葡萄糖稀释5%的碳酸氢钠进行静脉注射; 肌肉注射维生素B₁, B₆, B₁₂; 由于该猫伴有肝功能异常, 肌肉注射肝泰乐促进肝细胞的恢复。

治疗七天后, 食欲逐渐恢复, 可以吃一些稀饭, 后肢可以站立。9月1日再次进行肝肾的血清学检测(见表2)及尿液检测(见表1)。从检测结果可知肌酐、尿素氮、磷的指标都有所下降; 同时尿液中的管型, 肾上皮细胞等都有所减少。继续进行治疗, 但治疗方案改为隔2天用药1次, 治疗15天后, 该猫食欲基本正常, 可以进行走动, 精神好转。

9月16日再次进行肝肾的血清学检测(见表2)。从检测结果来看主要指标都基本接近正常, 故停止进行药物治疗, 建议主人饲喂处方量或低磷低蛋白的食物, 同时注意补充维生素。

4 小结与讨论

4.1 猫的慢性肾衰病因较为复杂, 有先天性肾功能不全, 也有后天慢性疾病、中毒等因素。该病的发生与年龄、环境、疾病、饮食密切相关。该病例可能是由于长期饲喂某一种猫粮而引起慢性肾衰。临床上有很多报道, 由于一些猫粮中含有三聚氰胺, 长期饲喂导致慢性肾衰。

4.2 现阶段对慢性肾衰的诊断是通过实验室检

表1 尿液检测

检测日期	酸碱度	比重	脂肪滴	蛋白	葡萄糖	红细胞	白细胞	管型	肾上皮细
8月25日	6.0	1.011	可见	++ ¹⁾	+	5-7 ²⁾	8-10	4-6	4-6
9月1日	5.5	1.025	可见	++	+	3-5	5-8	3-5	4-6

1): “+”代表弱阳性; 2) 红细胞、白细胞、管型、肾上皮细胞的结果表示视野中的个数。

表 2 血液生化检测

项目	结果			参考值
	8月25日	9月1日	9月16日	
谷草转氨酶 (U/L)	89.7	67.5	72.1	7-50
谷丙转氨酶 (U/L)	31.2	30.2	45.6	0-100
碱性磷酸酶 (U/L)	159.6	159.6	147.2	0-200
总蛋白 (g/L)	153.3	102.3	65.7	50-78
白蛋白 (g/L)	51.6	51.6	39.9	22-35
肌酐 (umol/L)	1301.0	913.5	403.3	20-110
球蛋白 (g/L)	409.8	136.9	64.7	28-43
白 / 球比例	0.10	0.39	0.62	0.79-0.81
γ -谷氨酰转移酶 (U/L)	27.1	16.2	15.5	0-8
总胆红素 (μ mol/L)	11.9	9.6	8.3	0-6.8
直接胆红素 (μ mol/L)	19.2	6.7	11.4	0-0.4
尿素氮 (mmol/L)	88.5	59.4	28.8	3-9
葡萄糖 (mmol/L)	19.94	12.23	9.97	3.5-5.5
乳酸脱氢酶 (U/L)	1030	864	421	30-112
钙 (mmol/L)	3.72	2.56	2.43	2.2-2.9
磷 (mmol/L)	9.04	5.33	3.21	0.5-2.6

查,主要是尿液检测和肝肾的血清学检测。在血清学检测中最敏感的指标就是肌酐、尿素氮、钙和磷。从该病例的检测结果来看主要指标均高于正常值,从而判断该猫肾脏损伤严重,肾功能衰弱。

4.3 肾脏是机体重要的代谢器官,具有排泄废物、调节电解质平衡、分泌红细胞生成素及肾素、促进红细胞生成和血管紧张的功能。对于肾衰的治疗主

要是进行对症治疗和辅助治疗。如对肾衰出现的营养缺乏、电解质混乱、呕吐、贫血、脱水等进行对症治疗,同时对饮食进行调整来控制病情。该病例在治疗的同时给于一些含优质蛋白和充足维生素的食物或处方粮,在治疗的后期根据病情的恢复程度逐渐减少用药,利用食物疗法来调整肾功能。

2008“永顺杯”优秀论文评选启事

为促进科学技术的进步与创新,活跃学术气氛,将畜牧兽医科技推向一个新的水平,经广东省畜牧兽医学会七届六次常务理事扩大会议研究决定,在《广东畜牧兽医科技》杂志中评选 2008 年度“永顺杯”优秀论文。本刊将组织评委会专家进行评审,对获奖的优秀论文作者颁发证书及奖金。评选结果将于本刊 2009 年第 1 期公布。

- 1、**评选范围:**本刊 2008 年度 1-6 期发表的文章。
- 2、**评选数量:**优秀论文数篇,分设一、二、三等奖。其中以学术研究类为主,兼顾综述类与实用技术类。
- 3、**奖金来源:**奖金由广东永顺生物制药有限公司赞助。

欢迎广大畜牧兽医工作者踊跃投稿

《广东畜牧兽医科技》编辑部
二〇〇八年一月二十六日